

JÉSSICA FERNANDA DA SILVA LOPES

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS  
DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus pseudintermedius* e  
*Staphylococcus schleiferi* RELACIONADAS À  
MOTILIDADE EM MEIO SEMISSÓLIDO**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como  
pré-requisito para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO**

Agosto/ 2022

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Rosana Barreto Rocha Ferreira.**

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

L864c      Lopes, Jéssica Fernanda da Silva  
Características fenotípicas e genotípicas de amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* relacionadas à motilidade em meio semissólido / Jéssica Fernanda da Silva Lopes. -- Rio de Janeiro, 2022.  
60 f.

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Motilidade. 2. *Staphylococcus pseudintermedius*. 3. *Staphylococcus schleiferi*. I. Ferreira, Rosana Barreto Rocha, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Jéssica Fernanda da Silva Lopes**  
DRE: 118027083

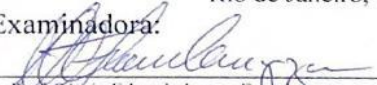
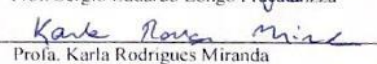
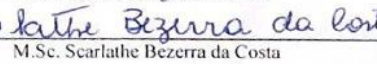
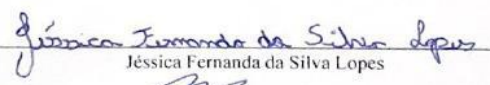


BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)  
Profª. Karla Rodrigues Miranda  
M.Sc. Scarlathe Bezerra da Costa  
Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Suplente)

Título da Monografia: **“Características fenotípicas e genotípicas de amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* relacionadas à motilidade em meio semissólido”**

Local: **Sala D-27/ IMPPG / CCS / UFRJ**  
Data e hora de início: **17 de agosto de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	 _____ Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
<u>10,0</u>	 _____ Profª. Karla Rodrigues Miranda
<u>10,0</u>	 _____ M.Sc. Scarlathe Bezerra da Costa
	_____ Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
Aluno:	 _____ Jéssica Fernanda da Silva Lopes
Orientador:	 _____ Profª. Rosana Barreto Rocha Ferreira
Coordenador de TCC	 _____ Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui, por toda força e perseverança que me concedeu ao longo deste caminho. Agradeço imensamente a minha família por todo apoio e incentivo durante toda minha vida. Em especial, agradeço a minha mãe, Luciana, que é meu alicerce, minha inspiração, a base de tudo em minha vida. Mãe, muito obrigada por nunca me deixar desistir. Obrigada por todas as noites em que me encontrava desesperada com as provas e você me dizia: não entendo muito sobre microbiologia, mas posso ficar acordada a noite inteira te fazendo companhia e te dando todo meu apoio. Te amo! Tudo isso é por você, mãe.

Agradeço a minha irmã, Joyce, que não aguenta mais ouvir “*Staphylococcus*”, mas se eu pedir pra assistir meu projeto dez vezes, ela estará lá ouvindo sobre o mesmo assunto e me dando todo apoio, você é uma inspiração para mim! Agradeço ao meu namorado, Wesley, por estar sempre me apoiando e torcendo por mim. Obrigada por se mostrar sempre tão interessado na minha pesquisa e apelidando carinhosamente meu *Staphylococcus* de “Estive”. Você é um presente na minha vida! Agradeço ao meu Tio, Luciano e ao meu avô do coração, Benedito, por nunca medirem esforços para me ver bem. Obrigada por toda ajuda e suporte que me deram, e me dão todos os dias. E, não poderia deixar de agradecer aos meus avós, José Mario e Denize, por todo amor, por tudo... Infelizmente, não estão aqui para presenciar essa minha conquista, mas sempre estarão presentes no meu coração, vocês me fazem muita falta!

Agradeço a todos meus amigos que sempre me deram apoio durante esta jornada. A micro me deu vários presentes, principalmente, Bianca, Luana e Victória, que tornaram essa caminhada mais leve. Agradeço a toda minha família científica Andressa, Carol, Clara, Giulia, Juliana Curityba, Juliana Reviello, Larissa, Marcos, Raquel, Rayssa e Thais. E, especialmente ao meu eterno coorientador, Thiago. Thi, muito obrigada por todos os ensinamentos, você foi essencial para minha formação, o melhor coorientador que eu poderia ter. Obrigada por tudo!

Um agradecimento mais que especial a minha orientadora, Rosana. Rô, não tenho palavras para descrever o quão importante você foi nesta jornada. Obrigada por ter me orientado, por ter me ensinado tanto e por ter confiado em mim. Você contribuiu muito não só em minha vida acadêmica, mas também em minha vida pessoal. Obrigada por ter me apoiado mesmo em momentos tão difíceis, e por não ter me deixado desistir deste sonho. Você é incrível! Obrigada por tanto!

Agradeço imensamente a todos os professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por todo conhecimento e por terem contribuído para minha formação acadêmica e profissional. Agradeço, também, a todos os membros da banca avaliadora por terem aceitado o meu convite para fazerem parte desse momento tão especial.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

## RESUMO

JÉSSICA FERNANDA DA SILVA LOPES

### CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* RELACIONADAS À MOTILIDADE EM MEIO SEMISSÓLIDO

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Embora sejam frequentemente considerados imóveis, a motilidade dentro do gênero *Staphylococcus*, já foi descrita para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus xylosus*. Estudos preliminares do nosso grupo demonstraram que *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* também apresentam motilidade em meio semissólido. Em *S. aureus*, a motilidade é associada à produção de modulinas solúveis em fenol. Essas modulinas atuam como surfactantes e sua expressão é regulada pelo gene acessório regulador (*agr*), um sistema de *quorum sensing* responsável pela regulação de genes de virulência em *Staphylococcus* spp. Neste estudo, ampliamos o número de amostras de *S. pseudintermedius* (49 amostras) e *S. schleiferi* (30 amostras) testadas anteriormente quanto à motilidade em meio semissólido e avaliamos o impacto da adição de glicose (1%) ou NaCl (1%) ao meio na motilidade destas espécies. Além disso, investigamos a presença dos genes *agrA*, *agrBD*, *agrC*, *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *tagO* e *srtA* nas amostras de *S. pseudintermedius*, e a presença de *agrB*, *ctaA*, *dltA*, *tagO* e *srtA* em *S. schleiferi*. Estes genes foram selecionados por terem sido anteriormente associados à motilidade de *S. aureus* em superfícies. Para o ensaio de motilidade, as amostras foram cultivadas e inoculadas em meio TSB suplementado com 0,24% de ágar e incubadas a 37 °C por 24 h. A motilidade foi medida e comparada entre amostras controle, previamente estabelecidas no laboratório. A detecção dos genes selecionados foi realizada através de reações em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados revelaram que todas as amostras das duas espécies testadas apresentaram o fenótipo de motilidade em meio semissólido, sendo 36,7% (29 amostras) das amostras classificadas como motilidade alta, 26,5% (21 amostras) como motilidade média e 36,7% (29 amostras) como motilidade baixa. A adição de 1% de glicose ao meio semissólido resultou no aumento do espalhamento de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*, enquanto a adição de 1% de NaCl resultou na diminuição do espalhamento nas duas espécies. Todas as amostras de *S. pseudintermedius* apresentaram os genes *ctaA*, *dltA*, *tagO* e *srtA*, mas apenas 42% das amostras apresentaram todos os genes do operon *agr*. Em *S. schleiferi*, 93,3% das amostras apresentaram o gene *ctaA*, 86,6% apresentaram o gene *tagO*, 76,6% apresentaram o gene *dltA* e 23,3% apresentaram o gene *srtA*. A motilidade em superfícies é um fenômeno pouco estudado no gênero *Staphylococcus* e nosso grupo relatou pela primeira vez a motilidade em *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*. Entender o funcionamento da motilidade nestas espécies pode elucidar a biologia destes microrganismos e seus mecanismos de colonização, sobrevivência e patogênese.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, motilidade, *quorum sensing*.

## ABSTRACT

JÉSSICA FERNANDA DA SILVA LOPES

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* RELACIONADAS À MOTILIDADE EM MEIO SEMISSÓLIDO

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Although they are often considered non-motile, motility within the genus *Staphylococcus*, has already been described for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus xylosus*. Preliminary studies by our group have shown that *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* also exhibit motility in semisolid medium. In *S. aureus*, motility is associated with the production of phenol-soluble modulins. These modulins act as surfactants and their expression is regulated by the accessory regulator gene (*agr*), a *quorum sensing* system responsible for the regulation of virulence genes in *Staphylococcus* spp. In this study, we extended the number of *S. pseudintermedius* (49 strains) and *S. schleiferi* (30 strains) strains previously tested for motility in semisolid medium and evaluated the impact of adding glucose (1%) or NaCl (1%) to the medium on the motility of these species. In addition, we investigated the presence of *agrA*, *agrBD*, *agrC*, *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *tagO* and *srtA* genes in *S. pseudintermedius* strains, and the presence of *agrB*, *ctaA*, *dltA*, *tagO* and *srtA* in *S. schleiferi*. These genes were selected because they have been previously associated with *S. aureus* motility on surfaces. For the motility assay, strains were grown and inoculated in TSB medium supplemented with 0.24% agar and incubated at 37 °C for 24 h. Motility was measured and compared between control samples, previously established in the laboratory. Detection of the selected genes was performed by polymerase chain reactions (PCR). The results revealed that all strains of the species tested presented the motility phenotype in semi-solid medium, approximately 36.7% (29 samples) of the samples classified as high motility, 26.5% (21 samples) as medium motility and 36.7% (29 samples) as low motility. The addition of 1% glucose to the semi-solid medium resulted in increased spreading of *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi*, while the addition of 1% NaCl resulted in decreased spreading in both species. All *S. pseudintermedius* strains showed the *ctaA*, *dltA*, *tagO* and *srtA* genes and only 42% of the samples showed the presence of all genes from the *agr* operon. In *S. schleiferi*, 93.3% of the samples showed the *ctaA* gene, 86.6% showed the *tagO* gene, 76.6% showed the *dltA* gene, and 23.3% showed the *srtA* gene. Motility on surfaces is a little studied phenomenon in the *Staphylococcus* genus and our group first reported motility in *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi*. Understanding the function of motility in these species may elucidate the biology of these microorganisms and clarify their mechanism of colonization, survival, and pathogenesis.

**Keywords:** *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. schleiferi*, motility, quorum sensing.



**RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS****JÉSSICA FERNANDA DA SILVA LOPES****CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* RELACIONADAS À MOTILIDADE EM MEIO SEMISSÓLIDO****Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O grupo de bactérias chamadas de *Staphylococcus* é considerado importante por ser capaz de causar infecções em humanos e animais. *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* são bactérias que vivem normalmente na pele e mucosas de cães sem causar nenhum problema. Quando há alguma alteração no sistema imune desses animais, essas bactérias podem causar infecções. Bactérias que conseguem se deslocar de um lado para o outro possuem vantagens nos ambientes em que vivem. Essas bactérias que se movimentam conseguem uma maior quantidade de nutrientes para sobreviverem, e também, isso ajuda no seu potencial de causar doenças no hospedeiro. As bactérias chamadas de *Staphylococcus* foram consideradas imóveis durante muito tempo, mas alguns cientistas descobriram que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus xylosum* conseguem se mover. Com essa descoberta, nosso laboratório começou a investigar se as outras bactérias desse grupo também conseguiam se movimentar. Descobrimos que cinco outras bactérias desse grupo também eram capazes de se locomover em superfícies, incluindo *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* que são importantes bactérias para os cães. Agora, estamos investigando como essas bactérias conseguem se mover, e essa descoberta pode ser muito importante para conseguirmos descobrir uma nova forma de combater as infecções que elas causam.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura e regulação do operon *agr* de *S. aureus* .....5
- Figura 2:** Controles do ensaio de motilidade em TSB + 0,24% de ágar. A: amostra *S. aureus* MU50 (controle negativo); B: amostra *S. pseudintermedius* RF30 (controle positivo)..... 23
- Figura 3:** Morfologia das colônias móveis de *S. pseudintermedius* em TSB + 0,24% de ágar. A: amostra RF30; B: amostra 1610; C: amostra 1729; D: amostra 1634.....24
- Figura 4:** Morfologia das colônias móveis de *S. schleiferi* em TSB + 0,24% de ágar. A: amostra 1664 B: amostra 1682; C: amostra 1715; D: amostra 1667 .....27
- Figura 5:** Morfologia das colônias móveis de *S. pseudintermedius* em TSB + 0,24% de ágar e suas respectivas suplementações. A: amostra RF30 em meio semissólido; B: amostra RF30 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose; C: amostra RF30 em meio semissólido suplementado com 1% de NaCl.....29
- Figura 6:** Morfologia das colônias móveis de *S. schleiferi* em TSB + 0,24% de ágar e suas respectivas suplementações. A: amostra 1715 em meio semissólido; B: amostra 1715 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose; C: amostra 1715 em meio semissólido suplementado com 1% de NaCl.....30
- Figura 7:** Detecção dos genes *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *tagO* e *srtA* em *S. pseudintermedius* e dos genes *ctaA*, *dltA*, *srtA* e *tagO* em *S. schleiferi* ..... 35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características das 49 amostras caninas de <i>S. pseudintermedius</i> utilizadas neste estudo .....	<b>15</b>
<b>Tabela 2:</b> Características de 30 amostras caninas de <i>S. schleiferi</i> utilizadas neste estudo .....	<b>17</b>
<b>Tabela 3:</b> Oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons gerados na PCR para detecção dos genes <i>agrA</i> , <i>agrBD</i> , <i>agrC</i> , <i>ctaA</i> , <i>dltA</i> , <i>nuc2</i> , <i>srtA</i> e <i>tagO</i> em <i>S. pseudintermedius</i> ..	<b>21</b>
<b>Tabela 4:</b> Oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons gerados na PCR para detecção dos genes <i>agrB</i> , <i>ctaA</i> , <i>dltA</i> , <i>srtA</i> e <i>tagO</i> em <i>S. schleiferi</i> .....	<b>22</b>
<b>Tabela 5:</b> Motilidade das amostras de <i>S. pseudintermedius</i> em meio semissólido e controles (MU50 e RF30) .....	<b>25</b>
<b>Tabela 6:</b> Motilidade das amostras de <i>S. schleiferi</i> em meio semissólido e controles (MU50 e RF30) .....	<b>28</b>
<b>Tabela 7:</b> Motilidade da amostra de <i>S. pseudintermedius</i> RF30 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose ou 1% NaCl.....	<b>30</b>
<b>Tabela 8:</b> Motilidade da amostra de <i>S. schleiferi</i> 1715 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose ou 1% NaCl.....	<b>31</b>
<b>Tabela 9:</b> Detecção dos genes <i>agrA</i> , <i>agrBD</i> e <i>agrC</i> nas amostras de <i>S. pseudintermedius</i> .....	<b>32</b>
<b>Tabela 10:</b> Detecção de <i>agrB</i> nas amostras de <i>S. schleiferi</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabela 11:</b> Detecção dos genes <i>ctaA</i> , <i>dltA</i> , <i>srtA</i> e <i>tagO</i> em <i>S. schleiferi</i> . .....	<b>37</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<i>Agr</i>	Do inglês <i>accessory gene regulator</i>
MRSF	Do inglês Methicillin-resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
ND	Não determinado
pb	pares de base
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSMs	Do inglês <i>Phenol-soluble Modulins</i>
qPCR	Do inglês <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Negativo
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Positivo
SIG	<i>Staphylococcus intermedius</i>
TSA	Do inglês <i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	Do inglês <i>Tryptic Soy Broth</i>

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Staphylococcus spp</i> .....	1
1.2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	2
1.3 <i>Staphylococcus schleiferi</i> .....	4
1.4 Gene acessório regulador ( <i>agr</i> ) .....	4
1.5 Motilidade bacteriana .....	6
1.5.1 Motilidade em <i>Staphylococcus spp</i> .....	8
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 Amostras bacterianas.....	14
4.2. Ensaio de motilidade em meio semissólido.....	18
4.3 Extração de DNA das amostras de <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. schleiferi</i> .....	19
4.4 Detecção dos genes <i>agrA</i> , <i>agrBD</i> , <i>agrC</i> , <i>ctaA</i> , <i>dltA</i> , <i>nuc2</i> , <i>srtA</i> e <i>tagO</i> em <i>S. pseudintermedius</i> e <i>agrB</i> , <i>tagO</i> , <i>srtA</i> , <i>ctaA</i> e <i>dltA</i> em <i>S. schleiferi</i> .....	20
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
5.1 Avaliação da motilidade das amostras de <i>S. pseudintermedius</i> e <i>S. schleiferi</i> .....	23
5.1.1 <i>S. pseudintermedius</i> .....	24
5.1.2 <i>S. schleiferi</i> .....	27
5.1.3 Fenótipo de motilidade da amostra RF30 de <i>S. pseudintermedius</i> testada com a suplementação de 1% de glicose ou 1% de NaCl no meio semissólido .....	29
5.1.4 Fenótipo de motilidade da amostra 1715 de <i>S. schleiferi</i> testada com a suplementação de 1% de glicose ou 1% de NaCl no meio semissólido.....	30
5.2. Detecção dos genes <i>agrA</i> , <i>agrBD</i> e <i>agrC</i> nas amostras de <i>S. pseudintermedius</i> .....	31
5.3. Detecção do gene <i>agrB</i> nas amostras de <i>S. schleiferi</i> .....	33
5.4. Detecção dos genes <i>ctaA</i> , <i>dltA</i> , <i>nuc2</i> , <i>tagO</i> e <i>srtA</i> em amostras de <i>S. pseudintermedius</i> e dos genes <i>ctaA</i> , <i>dltA</i> , <i>srtA</i> e <i>tagO</i> em <i>S. schleiferi</i> .....	35
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez por Alexander Ogston em 1880 (Ogston, 1880 apud Cheng *et al.*, 2011) e atualmente engloba 84 espécies e 30 subespécies (LSPN, 2022). O gênero é formado por cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados que possuem um arranjo espacial semelhante a cachos de uva e são capazes de crescer em meios de cultura contendo altas concentrações de sal. Estas bactérias estão comumente presentes na pele e membranas mucosas de humanos, mas também são consideradas importantes patógenos, responsáveis por diversos quadros patológicos, como infecções de pele, trato urinário, ossos, tecidos moles e infecções oportunistas (Murray *et al.*, 2017).

As espécies de *Staphylococcus* são divididas em dois grandes grupos de acordo com a presença da proteína coagulase em *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) (Devriese *et al.*, 2005; Sewid *et al.*, 2018). A produção da coagulase induz a coagulação de fibrina, sendo um importante fator de virulência, uma vez que esses coágulos de fibrina protegem o patógeno dos sistemas de defesa do hospedeiro (Madigan *et al.*, 2016).

No gênero *Staphylococcus*, sete espécies pertencem ao grupo *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus coagulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus pseudintermedius* (Balbutskaya, Dmitrenko e Skvortsov, 2017; Madhaiyan, Wirth e Saravanan, 2020). Dentre as espécies de SCP, *S. aureus* é o principal patógeno de importância clínica, sendo frequentemente isolado da pele e mucosa nasal de humanos (Von Eiff *et al.*, 2001) e *S. pseudintermedius*, frequentemente isolado da mucosa de cães e gatos, sendo considerado um importante patógeno na clínica veterinária (Devriese *et al.*, 2005).

As espécies que possuem maior importância clínica dentre os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) são *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus epidermidis*, este último considerado o principal patógeno SCN (Huebner e Goldmann, 1999; Becker, Heilmann e Peters, 2014; Christensen e Brüggemann, 2014). *S. schleiferi* é uma das principais espécies isoladas de otite externa e

piodermite (Assumpção *et al.*, 2020), e tornou-se uma questão significativa na medicina veterinária, principalmente, devido a seus fatores de virulência e alta resistência antimicrobiana (Lee *et al.*, 2019).

### 1.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

*S. pseudintermedius* foi descrito pela primeira vez em 2005, (Devrise *et al.*, 2005) pertence ao grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) juntamente com outras duas espécies, *S. intermedius* e *S. delphini* e ao grupo dos SCP (Kadlec e Schwarz, 2012). Esta espécie é uma bactéria comensal da pele e mucosa de cães e gatos saudáveis (Maali *et al.*, 2018). Entretanto, é considerada um importante patógeno oportunista, capaz de causar doenças em hospedeiros que possuem o sistema imune comprometido ou quando há uma quebra da barreira externa da pele (Weese e Duijkeren, 2010). Esta espécie causa infecções de pele, como pioderma, abscessos, infecções em feridas, sendo o principal responsável pela ocorrência de otite externa em cães (Devriese *et al.*, 2005). Além disso, pode causar infecções em outros tecidos e cavidades corporais, como, por exemplo em trato urinário, respiratório e reprodutivo (Cox *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 2006b; Lynch e Helbig, 2021). Apesar de ser comumente associado a infecções caninas, *S. pseudintermedius* já foi relatado também como patógeno humano descrito em casos esporádicos de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade (Van Hoovels *et al.*, 2006; Somayaji *et al.*, 2016).

Essa espécie apresenta uma variedade de fatores de virulência similares aos descritos em *S. aureus*, como proteases, leucocidinas e proteína A (Fitzgerald, 2009; Abouelkhair *et al.*, 2018b; Balachandran *et al.*, 2018). *S. pseudintermedius* possui proteínas superficiais envolvidas na patogênese como SpsD, SpsL e SpsO que são associadas à adesão aos tecidos do hospedeiro (Bannoehr *et al.*, 2011). Além disso, a proteína SpsO, expressa na superfície celular, auxilia a bactéria no escape da opsonização e da fagocitose se ligando à região Fc de imunoglobulinas G (IgG) em cães. O gene *spsO*, que codifica esta proteína, é análogo ao gene que codifica a proteína A (*spA*) em *S. aureus*, sendo relatado como um determinante da virulência em *S. pseudintermedius* (Bannoehr *et al.*, 2011; Balachandran, Bemis e Kania, 2018).

Outro fator importante na virulência de *S. pseudintermedius* é a secreção de toxinas (Pitchenin *et al.*, 2016). Existem três grupos de toxinas estafilocócicas já descritos: toxinas

pirogênicas que apresentam propriedades de superantígenos compostas pela toxina da síndrome do choque tóxico e por enterotoxinas; as toxinas esfoliativas e citotoxinas, como leucocidinas e hemolisinas (Pitchenin *et al.*, 2016). *S. pseudintermedius* produz as leucocidinas LukS-I e LukF-I que induzem a lise celular (Prevost *et al.*, 1995; Maali *et al.*, 2018). Além das leucocidinas, esse microrganismo secreta modulinas solúveis em fenol (PSMs) e hemolisinas que possuem atividades citotóxicas (Kmieciak, Szewczyk e Ciszewski, 2016; Maali *et al.*, 2018)

Assim como outras espécies de estafilococos, *S. pseudintermedius* é capaz de formar biofilme, sendo esta uma característica importante para sua virulência. A formação de biofilmes por *S. pseudintermedius* pode levar a complicações graves em locais cirúrgicos e infecções de feridas em animais (Frank e Loeffler, 2012). O biofilme bacteriano pode levar a infecções crônicas que apresentam dificuldades no tratamento devido a sua capacidade de reduzir o alcance e a eficácia de moléculas antimicrobianas e do sistema imune (Dongari-Bagtzoglou, 2008). O biofilme é composto por células bacterianas aderidas a uma superfície biótica ou abiótica que estão embebidas por uma matriz extracelular que pode ser composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (Madigan *et al.*, 2016). A formação de biofilmes ocorre em três importantes fases: adesão, maturação e dispersão das células bacterianas para novos sítios de infecções no hospedeiro (Dotto, 2021).

A resistência aos antimicrobianos também é um importante fator para a virulência desta espécie. Cada vez mais tem sido relatado em hospitais veterinários casos de infecções por *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), sendo a principal causa de piodermas e infecções de sítios cirúrgicos (Bryan *et al.*, 2012; Frank e Loeffler, 2012). Esses crescentes casos de infecções por MRSP causam uma grande preocupação, visto que apresentam resistência a terapias antimicrobianas tradicionais, levando a dificuldade do tratamento dessas infecções (Terry e Neethirajan, 2014). A resistência à meticilina é mediada pela expressão do gene *mecA* que codifica uma proteína modificada de ligação à penicilina (PBP2a) presente no cromossomo *mec* (*SCCmec*) em *Staphylococcus* (Kadlec e Achwarz, 2012). Esta proteína tem baixa afinidade por todos os antimicrobianos beta-lactâmicos como penicilina, meticilina, oxacilina, cefalosporina e carbapenêmicos, limitando as opções de tratamento (Weese e Duijkeren, 2010). Os MRSP são considerados um problema emergente na clínica veterinária, tanto do ponto de vista da saúde animal, como também de saúde pública (Weese e Duijkeren, 2010).



### 1.3 *Staphylococcus schleiferi*

Em 1988, *S. schleiferi* foi identificado pela primeira vez como uma espécie de estafilococos coagulase-negativa isolada de humanos (Freney *et al.*, 1988). Subsequentemente, em 1990, foi isolado um subtipo *S. schleiferi* coagulase-positiva de cães com otite externa (Igimi, Takahasi e Mitsuoka, 1990). Desde então, este microrganismo foi classificado e dividido em duas subespécies com base na produção de coagulase: *S. schleiferi* subespécie *schleiferi* (coagulase-negativa) e *S. schleiferi* subespécie *coagulans* (coagulase-positiva) (Cain *et al.*, 2011). Recentemente, um estudo sugeriu uma reclassificação, dividindo as duas subespécies de *S. schleiferi* em novas espécies: *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus coagulans*. Essa reclassificação foi feita através de análises filogenéticas baseadas em sequência genéticas que codificam para a subunidade 16S do RNA ribossomal (Madhaiyan, Wirth e Saravanan, 2020).

*S. schleiferi* é comumente relatado como responsável por infecções em cães associados, principalmente, à pioderma e otites, sendo considerado uma importante preocupação zoonótica (Cain *et al.*, 2013; Lee e Yang, 2020). A espécie é raramente relatada como patógeno humano, mas pode causar infecção disseminada em pacientes imunocomprometidos (Ezaki *et al.*, 2020). Apesar de ser raramente relatado na literatura, já foram descritos casos de *S. schleiferi* em síndromes clínicas como osteomielite, endocardite, meningite pediátrica, infecções de ferida cirúrgica e infecções nosocomiais do trato urinário (Nguyen, Ahern e Train, 2020).

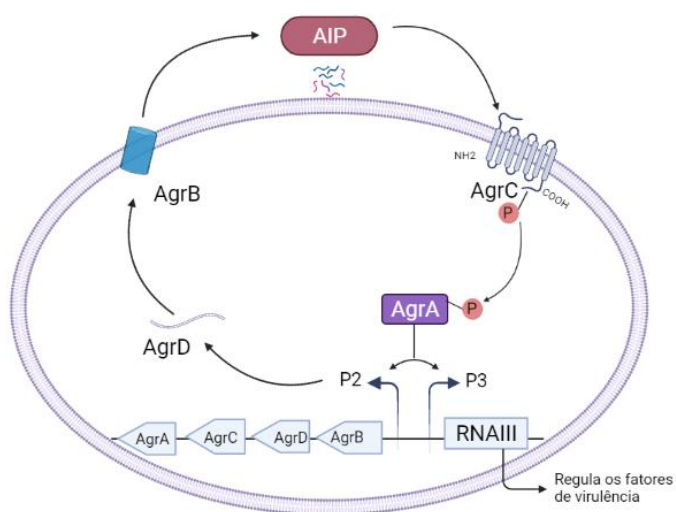
Apesar de ainda ser relativamente pouco estudada, esta espécie possui fatores de virulência que incluem proteases, esterase, lipases, exoenzimas,  $\beta$ -hemolisina e produção de proteína ligadora de fibronectina que estão envolvidos com infecções nosocomiais de *S. schleiferi* (Cain *et al.*, 2011; Nguyen, Ahern e Train, 2020).

### 1.4 Gene acessório regulador

O gene acessório regulador (*agr*) é um sistema de *quorum-sensing*, ou seja, é um sistema de comunicação celular que coordena mudanças de comportamento dependentes da densidade populacional (Abisado *et al.*, 2018). O operon *agr* é responsável pela regulação da expressão dos fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. (Gillaspy, 1995; Le e Otto, 2015). A atividade do operon *agr* está envolvida na transcrição de RNAII e RNAIII, cuja expressão é impulsionada pelos promotores P2 e P3 (Tsompanidou, 2011) (Figura 1). Na transcrição do RNA II, o promotor P2 controla a expressão de *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*, cujos produtos estão envolvidos no *quorum-*

*sensing* bacteriano. No RNA III, a transcrição é regulada pelo promotor P3, que codifica  $\delta$ -hemolisina (*Hdl*), um peptídeo cíclico da família das PSMs (Dotto, 2021).

O AgrD é o precursor do peptídeo autoindutor do sistema (AIP). O AgrD é processado pela proteína transmembrana AgrB, que realiza a ativação, secreção e modificação do AIP. A molécula AIP é então detectada por um sistema de dois componentes de receptor quinase AgrC e AgrA (Tsompanidou *et al.*, 2010; Little, 2019). Ao vincular o AIP ao receptor AgrC, o regulador de resposta AgrA é ativado e se liga aos promotores P2 e P3, assim iniciando a transcrição de *agrBDCA* e RNAIII (Nakamura *et al.*, 2020). RNAIII é a principal molécula intracelular efetora do sistema *agr* (Novick *et al.*, 1993), ela regula a expressão da maioria dos genes-alvo dependentes desse sistema (Jenul e Horswill, 2019) e induz a expressão de diversos fatores de virulência, incluindo toxinas e enzimas envolvidas na regulação do crescimento e adaptação dos patógenos nos sítios de infecção (Nakamura *et al.*, 2020). Entre os genes regulados por RNAIII envolvidos na virulência estão alfatoxina (*hla*), lipase (*geh*), cisteínas proteases (*scpA*, *sspB*), serinas proteases (*splA-F*, *sspA*), gama-hemolisina (*hlg*) e leucocidinas (*lukAB*, *lukGH*) (Jenul e Horswill, 2019). Além disso, o RNAIII regula positivamente a expressão de toxinas como  $\alpha$ -hemolisina, e regula negativamente a expressão de adesinas de superfície, como a proteína A (Pollitt e Diggle, 2017).



**Figura 1:** Estrutura e regulação do operon *agr* de *S. aureus*. Figura criada com BioRender ([BioRender.com](https://www.biorender.com)).

No gênero *Staphylococcus*, o gene *agr* foi descrito primeiramente em *S. aureus* (Novick e Geisinger, 2008), e atualmente já foi identificado para diversas outras espécies estafilocócicas (Canovas *et al.*, 2016; Little *et al.*, 2019). Em cepas de *S. pseudintermedius*, foram relatados quatro grupos de *agr* (AgrI, AgrII, AgrIII e AgrIV), que produzem quatro variantes AIP exclusivas (I, II, III e IV). As diferentes variantes existem devido a polimorfismos da molécula AIP que resultam na formação de grupos distintos, de acordo com o tipo de *agr* expresso pela cepa (Ji, Beavis e Novick, 1995; Bonnoehr *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2019). Em *S. aureus*, os diferentes grupos de *agr* resultantes do polimorfismo da molécula AIP, estão associados a certos tipos de infecções como endocardite e bacteremia, porém, em *S. pseudintermedius* essa associação ainda não está bem esclarecida (Jerraud *et al.*, 2002; Bonnoehr *et al.*, 2007). No entanto, um estudo observou que AgrII foi significativamente mais encontrado em cães doentes, enquanto a presença dos outros três tipos de *agr* não tiveram associações significativas entre cães com doenças ou saudáveis (Little *et al.*, 2019). Um estudo demonstrou que *S. schleiferi* expressa atividade inibitória potente e ativa contra todas as quatro classes de *agr* encontradas em *S. aureus*. Essa inibição acontece através da molécula AIP presente em *S. schleiferi* que inibe a expressão do RNA III via atividade agonista do *agrC* (Canovas *et al.*, 2016).

Além de ser responsável pela regulação dos fatores de virulência em *S. aureus*, foi relatado também que o operon *agr* está envolvido com o fenótipo de motilidade desta espécie, através das PSMs que diminuem a tensão superficial do meio, facilitando então o deslocamento da bactéria (Le e Otto, 2015; Kaito e Sekimizu, 2007).

### 1.5 Motilidade bacteriana

A motilidade é crucial para a sobrevivência, patogênese e disseminação de diversos microrganismos em diferentes ambientes (Madigan *et al.*, 2016). Em alguns patógenos bacterianos, incluindo *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica* e *Bordetella pertussis*, a motilidade parece desempenhar um papel importante nas fases iniciais da infecção (Josenhans e Suerbaum, 2002). A motilidade bacteriana pode ser ativa ou passiva. Na motilidade ativa são usados mecanismos celulares dependentes de energia. Nesse tipo de motilidade, as bactérias têm o controle do direcionamento para onde se movem. Já na motilidade passiva, é

necessário que ocorra a modificação do ambiente, gerando força para que aconteça o impulsionamento das células (Pollitt e Diggle, 2017).

Oito tipos de translocações já foram descritos e suas classificações foram determinadas baseando-se no deslocamento em superfície de diferentes espécies: *swarming*, *swimming*, *gliding* e *twitching*, *surfing* e *surface-associated*, classificados como motilidade ativa. Além destes, também foram descritos os tipos de motilidade passiva, conhecidos como *sliding* e *darting* (Henrichsen, 1972).

*Swarming* é um tipo de movimento superficial dependente de flagelo (Henrichsen, 1972). O movimento é contínuo e regular, seguindo o eixo das células que ficam predominantemente agregados em feixes durante a translocação, apresentando um padrão micromorfológico altamente organizado. O *swarming* já foi descrito como forma de motilidade em algumas espécies bacterianas, como por exemplo *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Bacillus subtilis* (Pollitt e Diggle, 2017).

*Swimming* também é um tipo de movimento superficial que possui o mecanismo molecular dependente de flagelo, mas ele se diferencia do *swarming* porque as células se movem de forma individual e aleatória em superfícies, formando um padrão micromorfológico desorganizado (Henrichsen, 1972). Nesse tipo de translocação, a quimiotaxia também é um fator que está associado à motilidade. *Swimming* é realizado por bactérias como *E. coli* e *P. aeruginosa* (Pollitt e Diggle, 2017). Além disso, *swimming* também é observado em *Archaea*, mas há a substituição do flagelo por pili tipo IV (Herzog e Wirth, 2012).

*Gliding* é observado em espécies como *Myxococcus xanthus*, *Beggiatoa*, *Cyanobacteria*, *Mycoplasma* e *S. aureus* (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017). Esse tipo de locomoção, assim como *swarming*, apresenta um movimento contínuo e regular, mas seus mecanismos moleculares são muito diversificados. O movimento pode acontecer via pili tipo IV, complexos de adesão focal, deformação da membrana externa, produção de *slime*, e até mesmo, múltiplos mecanismos podem ser utilizados ao mesmo tempo (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017).

Na motilidade do tipo *twitching* o movimento é intermitente e irregular, não seguindo o eixo da célula (Henrichsen, 1972). Neste tipo de locomoção o pili tipo IV e a retração são responsáveis pelo movimento. Acontece uma contração em que o pili se estende e retrai para que as bactérias se locomovam através da superfície. Esse tipo de motilidade é observado em *Neisseria* spp. e *Pseudomonas* spp. (Pollitt e Diggle, 2017).

Descrito pela primeira vez em *P. aeruginosa*, *surfing* é uma forma de motilidade dependente da presença da glicoproteína mucina, que é um componente importante do muco respiratório (Thornton *et al.*, 1996; Yeung, Parayno e Hancock, 2012). Outras espécies como *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio harveyi*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis* também apresentam características de *surfing* em placas de ágar contendo mucina. Além disso, esse tipo de motilidade é geralmente mais rápido e menos dependente de viscosidade do que a motilidade *swimming* (Sun, Liu e Hancock, 2018).

A motilidade *surface-associated* é uma forma de locomoção observada em *Acinetobacter baumannii*. Existem diferentes fatores associados a esse tipo de motilidade, incluindo pili tipo IV, controle pela detecção de luz azul e requerimento da síntese de autoindutores (Mussi *et al.*, 2010; Clemmer *et al.*, 2011).

*Sliding* é um tipo de translocação superficial passiva, em que o movimento é produzido a partir de forças expansivas na cultura em combinação com as propriedades de cada superfície. O *sliding* apresenta um padrão micromorfológico uniforme em que suas células ficam unidas em uma camada única, devido a isso, seu movimento ocorre de forma lenta e como uma única unidade (Henrichsen, 1972). Essa locomoção ocorre a partir do crescimento bacteriano e produção de surfactantes, sendo encontrados em espécies como, por exemplo, do gênero *Streptococcus* e *S. aureus* (Pollitt e Diggle, 2017).

Outro tipo de motilidade superficial passiva é o *darting*, ainda pouco estudada, mas que pode ser observado em *S. epidermidis*. É um tipo de translocação produzida por forças expansivas, mas que são desenvolvidas em um agregado de células dentro de uma única cápsula comum resultando então, na ejeção das células desse agregado (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017).

#### 1.5.1 Motilidade em *Staphylococcus spp.*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são classicamente consideradas imóveis, principalmente por não possuírem apêndices que auxiliam na locomoção como, por exemplo, flagelo e pili (Jarrell e McBride, 2008; Murray, 2017). Apesar disso, a motilidade já foi descrita dentro do gênero para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* (Henrichsen, 1972; Kaito e Sekimizu, 2007; Dordet-frizoni, 2008).

Dois tipos diferentes de locomoção foram observados em *S. aureus*: *spreading*, um tipo de motilidade por deslizamento passivo similar ao *sliding*, e também *gliding*, caracterizado pelo deslizamento ativo e que envolve a formação de *comets*, estruturas semelhantes a cometas no ágar (Pollitt e Diggle, 2017). A motilidade em *S. aureus* está intimamente associada ao sistema *quorum-sensing* que responde a estímulos dependentes da densidade celular (Tsompanidou *et al.*, 2010). Outro fator importante para essa locomoção é a produção de PSMs que atuam como surfactantes e são dependentes do operon *agr* (Kaito e Sekimizu, 2007; Tsompanidou *et al.*, 2010). No *sliding*, as bactérias formam uma monocamada de células e pode-se observar essas bactérias sendo empurradas para fora da camada devido ao crescimento. Em contrapartida, na motilidade *gliding* são formadas múltiplas camadas desorganizadas (Henrichsen, 1972).

No *spreading*, há uma grande produção de surfactantes que fazem com que as bactérias se dispersem de forma individual, sendo importantes para mover essas células bacterianas (Pollitt e Diggle, 2017). Os surfactantes são compostos que reduzem a tensão superficial do meio (Jain *et al.*, 1991). Os principais surfactantes envolvidos no *spreading* são as PSM $\alpha$ 3 e PSM $\gamma$ , mais comumente chamado de  $\delta$ -hemólise (Tsompanidou *et al.*, 2013). Em *S. aureus*, o surfactante produzido é observado em forma de anel ao redor da colônia em espalhamento e, conforme essa colônia para de se mover, vai se dissipando ao longo do tempo. O surfactante também incentiva a incorporação de água para a ampliação da colônia (Pollitt e Diggle, 2017). O *spreading* observado em *S. aureus* apresenta características semelhantes ao *sliding* também em relação à importância dos surfactantes.

Além da produção de surfactantes, existem fatores de superfície celular que são importantes para que ocorra a propagação da motilidade em *S. aureus* (Kaito e Sekimizu, 2007; Tsompanidou *et al.*, 2012). Foi observado uma redução da capacidade de propagação das colônias ao realizar a deleção dos genes *tagO* e *yfpP* e do operon *dlt* que são envolvidos na síntese dos ácidos teicóicos presentes na parede celular de gram-positivas, indicando a importância destes no *spreading* (Kaito e Sekimizu, 2007).

Em uma análise de proteínas de secreção, foi observado que um mutante da sortase A (SrtA) que é uma proteína de exportação de superfície celular, apresentava uma alteração no fenótipo de propagação, resultando em um maior espalhamento (Tsompanidou *et al.*, 2012). Além da SrtA, outras proteínas relacionadas à adesão, como FnbpA, FnbpB, ClfA e ClfB, foram analisadas. Os resultados mostraram que a deleção de todos esses genes simultaneamente,

resultava em um aumento da propagação de *S. aureus*, sugerindo que ao diminuir a adesão, há uma maior propagação das colônias (Tsompanidou *et al.*, 2012; Pollitt e Diggle, 2017).

Foi visto também que, mutações nos genes *hemY* e *ctaA* que são responsáveis pela produção das enzimas protoporfirinogênio oxidase e heme A sintase, possuem impacto expressivo no *spreading* de *S. aureus*, mas esse impacto não afeta a expressão de outros genes relacionados ao fenótipo de motilidade (Hederstedt, 2012; Choby e Skaar, 2016; Dailey *et al.*, 2017).

Um estudo investigou se a digestão de DNA extracelular secretados por nucleases poderia estar envolvida com o *spreading* em *S. aureus* (Kaito *et al.*, 2011). O DNA extracelular já foi descrito como associado à formação de biofilme (Vorkapic, Pressler e Schild, 2016). As nucleases extracelulares de *S. aureus* são codificadas pelos genes *nuc1* e *nuc2* e, quando houve a deleção desses dois genes, foi observada uma redução significativa do *spreading*. Ao adicionar DNase, o *spreading* foi restaurado nos mutantes *nuc1* e *nuc2*, sugerindo que o DNA extracelular é necessário para propagação das colônias de *S. aureus* (Kaito *et al.*, 2011).

Outro fator também investigado por uma possível associação com *spreading* de *S. aureus*, foi um gene identificado como *fudoh*, localizado nos tipos I e II de *SCCmec* (Kaito *et al.*, 2008). O estudo sugeriu que o gene *fudoh* era capaz de suprimir o *spreading*, mas a ausência desse gene não causou um aumento nesse fenótipo, indicando que existem outros mecanismos que suprimem o *spreading* de *S. aureus*. Dentre os diversos fatores observados que possuem impactos no *spreading*, foi visto também que, a adição de glicose, glicerol, frutose e outros açúcares são capazes de estimular o *spreading* em *S. aureus* (Ueda *et al.*, 2011).

Além do *spreading*, *S. aureus* também realiza uma motilidade em que são formadas estruturas chamadas de *comets*. Esses *comets* procedem da formação de dendritos e são associados à expansão das colônias (Pollit, Cruz e Diggle, 2015). Essa locomoção possui características associadas à motilidade ativa *sliding* (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017). Em uma microscopia eletrônica de varredura, foi observado que as células que compõem o núcleo do *comets* estavam cercadas por uma matriz de iodo. Além disso, outra característica desta locomoção são os rastros físicos que ficam no ágar que podem ser explicados pelo movimento *sliding* (Pollit, Cruz e Diggle, 2015). Um comportamento associado à motilidade ativa e que foi observado no *comets* de *S. aureus*, é a capacidade que as colônias possuem de se evitar durante a locomoção (Pollit, Cruz e Diggle, 2015). O contato com o ágar é necessário para que ocorra o

movimento (Burchard, 1981). Essa locomoção também requer surfactantes PSMs, fazendo com que os *comets* se movam para o anel surfactante ao redor da colônia (Pollitt e Diggle, 2017). O mecanismo por trás da locomoção *comets* ainda é desconhecido, mas ele pode estar associado a algum dos vários mecanismos envolvidos com a motilidade *sliding* (Pollitt e Diggle, 2017).

A motilidade passiva *darting* já foi descrita em *S. epidermidis* (Henrichsen, 1972). Acredita-se que nessa locomoção, as bactérias formam aglomerados de células na superfície e crescem. À medida que há o crescimento, as células do agregado bacteriano são ejetadas (Pollitt e Diggle, 2017). A translocação que ocorre em *S. xyloso* se assemelha ao *darting* observado em *S. epidermidis*. Em particular, a motilidade de *S. xyloso* se mostra independente de surfactantes. Assim como em *S. epidermidis*, a locomoção de *S. xyloso* também exhibe comportamento de arremesso de células (Dordet-Frisoni *et al.*, 2008; Pollitt e Diggle, 2017). Assim como em *S. aureus*, o DNA extracelular parece estar envolvido com a locomoção de *S. xyloso*, uma vez que a suplementação do ágar com DNase aumentou a propagação das colônias (Dordet-Frisoni *et al.*, 2008).

A parte do que se sabe em *S. aureus*, muito pouco é conhecido sobre a motilidade em outras espécies de *Staphylococcus*. Nos últimos anos, nosso grupo vem focando em entender a ocorrência de motilidade em outras espécies e os mecanismos envolvidos. Descrevemos que além de *S. aureus*, amostras de *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*, *S. coagulans*, *S. capitis* e *S. lugdunensis* também são capazes de realizar motilidade (Coimbra, 2018). Entre estas espécies, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* destacaram-se por apresentarem alta motilidade na superfície do ágar semissólido. Também iniciamos a caracterização dos genes envolvidos na motilidade de *S. pseudintermedius* que parece ocorrer de forma diferente de *S. aureus* (Coimbra, 2021). Desvendar a presença de motilidade em *Staphylococcus*, como ela ocorre e a sua importância para a biologia do gênero pode gerar informações importantes para a prevenção e controle de infecções por estes microrganismos.



## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar do gênero *Staphylococcus* ser historicamente descrito como composto por espécies imóveis, a motilidade já foi descrita na literatura para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* (Henrichsen, 1972; Kaito e Sekimizu, 2007; Jarrell e McBride, 2008; Dordet-Frizoni, 2008). Nosso grupo também descreveu a presença de amostras móveis em *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*, *S. coagulans*, *S. capitis* e *S. lugdunensis* (Coimbra, 2018).

*S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* são duas espécies de grande importância na clínica veterinária, responsáveis por infecções como pioderma e otites em cães, além disso, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* já foram descritas também como patógenos humanos (Van Hoovels *et al.*, 2006; Somayaji *et al.*, 2016; Ezaki *et al.*, 2020).

Apesar de serem espécies consideradas emergentes na clínica veterinária, ainda existem poucos estudos na literatura sobre *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*. Sabe-se que a motilidade bacteriana é importante para aquisição de nutrientes, e também, importante para disseminação e patogênese em diversas espécies (Kaito e Sekimizu, 2007; Pollitt e Diggle, 2017). Em nosso trabalho anterior estas espécies apresentaram forte capacidade de se mover em meio semissólido, onde 100% das amostras foram classificadas como de média a alta motilidade (Coimbra, 2021).

Em *S. aureus*, sabe-se que o fenótipo de motilidade está associado com múltiplos fatores envolvidos na sua regulação. *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* possuem genes e fatores de virulências semelhantes aos de encontrados em *S. aureus*, dessa forma, é importante investigar a presença e associação destes genes com a motilidade destas duas espécies. Entender o funcionamento da motilidade pode elucidar a biologia destes microrganismos e esclarecer seu mecanismo de colonização, sobrevivência e patogênese.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de motilidade em superfícies semissólidas de amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* isoladas de sítios de colonização e infecção em cães. Além disso, visamos determinar a presença de genes previamente associados a este fenótipo em *S. aureus* e sua correlação com a motilidade nestas espécies.

Para isso, realizamos as seguintes etapas:

1. Avaliação da motilidade em meio semissólido de 49 amostras de *S. pseudintermedius* e 30 amostras de *S. schleiferi*;
2. Avaliação da motilidade em meio semissólido suplementado com glicose ou NaCl de amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*;
3. Determinação da presença dos genes *agrA*, *agrBD*, *agrC*, *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *srtA* e *tagO* nas cepas de *S. pseudintermedius*;
4. Determinação da presença dos genes *agrB*, *ctaA*, *dltA*, *srtA* e *tagO* nas cepas de *S. schleiferi*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 49 amostras de *S. pseudintermedius* e 30 de *S. schleiferi* previamente identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo) (Coimbra, 2018). Todas as amostras pertencem à coleção do Laboratório de Cocos Patogênicos e Microbiota localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Laboratório de Cocos Gram-positivos, localizado no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF), em parceria com o Dr. Bruno Penna. O sítio de isolamento e origem clínica destas amostras estão descritos na Tabela 1 e Tabela 2.

Além das amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*, foi utilizada como controle negativo do experimento de motilidade, uma amostra de *Staphylococcus aureus* MU50 por conta de sua característica *agr*-deficiente (Kuroda *et al.*, 2001). Esta amostra é imóvel em ágar semissólido.

**Tabela 1:** Características de 49 amostras caninas de *S. pseudintermedius* que foram utilizadas neste estudo.

<b>Amostra</b>	<b>Sítio de isolamento</b>	<b>Origem clínica</b>
RF35	pele	infecção
RF36	pele	infecção
RF37	pele	infecção
RF38	pele	infecção
RF39	pele	infecção
RF73	pele	infecção
SD12	pele	infecção
SD19	pele	infecção
SD20	pele	infecção
SD30	pele	infecção
SD31	pele	infecção
SD36	pele	infecção
SD37	pele	infecção
SD38	pele	infecção
SD39	pele	infecção
SD41	pele	infecção
SD44	pele	infecção
SD46	pele	infecção
SD55	pele	infecção
SD57	pele	infecção
SD61	pele	infecção
SD62	pele	infecção
SD77	pele	infecção
SD79	pele	infecção
SD99	pele	infecção

ND: não determinado

**Tabela 1:** continuação

<b>Amostra</b>	<b>Sítio de isolamento</b>	<b>Origem clínica</b>
8SD1	pele	infecção
13SD2	pele	infecção
16SD1	pele	infecção
ED99	ND	infecção
RF28	narina	colonização
RF29	narina	colonização
RF30	pele	infecção
RF31	pele	infecção
RF32	pele	infecção
RF33	pele	infecção
RF34	pele	infecção
1602	pele	infecção
1610	pele	infecção
1611	pele	infecção
1620	pele	infecção
1625	pele	infecção
1633	pele	infecção
1634	pele	infecção
1683	pele	infecção
16100	narina	colonização
16105	períneo	colonização
16107	narina	colonização
1729	narina	colonização
1733	narina	colonização

**Tabela 2:** Características de 30 amostras caninas de *S. schleiferi* que foram utilizadas neste estudo.

<b>Amostra</b>	<b>Sítio de isolamento</b>	<b>Origem clínica</b>
RF46	pele	infecção
RF47	pele	infecção
RF48	pele	infecção
RF49	ouvido	infecção
SD15	pele	infecção
SD23	pele	infecção
SD24	pele	infecção
SD25	pele	infecção
SD42	pele	infecção
SD43	pele	infecção
SD47	pele	infecção
SD52	pele	infecção
SD53	pele	infecção
SD54	pele	infecção
1604	pele	infecção
1605	pele	infecção
1608	pele	infecção
1660	ouvido	infecção
1664	pele	infecção
1667	urina	infecção
1668	pele	infecção
1670	pele	infecção
1671	pele	infecção
1679	pele	infecção
1680	pele	Infecção
1682	pele	Infecção

**Tabela 2:** continuação

<b>Amostra</b>	<b>Sítio de isolamento</b>	<b>Origem clínica</b>
16121	narina	Colonização
1715	ND	infecção
SCH04	ND	infecção
SCH08	ND	infecção

ND: não determinado

#### 4.2 Ensaio de motilidade em meio semissólido

Para realizar os ensaios de motilidade, as amostras bacterianas foram primeiramente semeadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar; Titan Biotech, Índia), e em seguida incubadas a 37 °C por 24h. Uma colônia de cada amostra foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth; Kasvi, Itália) e incubada a 37 °C por 24 horas.

Os ensaios de motilidade foram realizados de acordo com o descrito por Kaito e Sekimizu (2007), com algumas modificações (Coimbra, 2021). Nesse ensaio, foi utilizado o meio TSB contendo 1,5% de ágar (Becton, Dickinson, EUA) e o meio TSB suplementado com 0,24% de ágar (Becton, Dickinson, EUA). Os meios de crescimento utilizados para este estudo, foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos e, em seguida, mantidos a 55 °C em banho-maria. Após 30 minutos, foram vertidos 8 mL do TSB contendo 1,5% de ágar em placas de Petri (50 x 10 mm), essa base sólida é usada para sustentação do meio semissólido. Para a solidificação do meio, as placas ficaram abertas em fluxo laminar durante 10 minutos. Após os 10 minutos, foram vertidos 2 mL de TSB suplementado com 0,24% de ágar sobre o meio solidificado, 2 mL, e depois mantendo novamente as placas abertas em fluxo laminar por 10 minutos para que ocorra a solidificação do segundo meio.

O inóculo foi padronizado em relação a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) utilizando 2 mL de solução salina estéril 0,85% para obtenção de uma suspensão bacteriana. Foram inoculados 2 µL da suspensão bacteriana ao centro da placa de Petri, com cuidado para que a ponteira não encostasse no ágar. Após o inóculo, as placas foram mantidas por 5 minutos em fluxo laminar e, em seguida, seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 18 horas. Após a incubação, as colônias foram fotografadas, e seus diâmetros e áreas mensurados

com o auxílio de uma régua. O experimento foi repetido ao menos três vezes para cada amostra e a média do diâmetro de cada crescimento registrado.

Para os testes de motilidade com suplementação de glicose, foi feita a adição de dextrose monoidratada (INLAB, Brasil) a 1% preparada separadamente, e adicionada ao meio semissólido antes de ser vertido sobre a base sólida. Já a suplementação com 1% de NaCl foi realizada juntamente com a preparação do meio semissólido, adicionando a quantidade necessária de cloreto de sódio, P.A. (Isofar, Brasil) ao meio de cultura.

As amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* foram analisadas de acordo com a capacidade de realizar deslocamento em meio de cultura semissólido. A avaliação dos resultados foi feita de forma visual e mensurando a região de maior diâmetro da colônia em comparação com o diâmetro exibido pela amostra de *S. aureus* MU50 utilizada como controle negativo para motilidade (Coimbra, 2018).

#### 4.3. Extração de DNA das amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*

Para obtenção do DNA das amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*, foi realizada a lise bacteriana utilizando a resina Chelex-100 e a enzima proteinase K (20 mg/ml) conforme descrito por Pinto e colaboradores (2013). As colônias isoladas e previamente crescidas em TSA (Titan Biotech, Índia) foram transferidas, com o auxílio de uma alça bacteriológica de 1 µL, para microtubos estéreis e suspensas em solução contendo 200 µL de Chelex (Bio-Rad, EUA) 5% (p/v) e 2 µL de proteinase K (20 mg/mL; Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA), e incubadas em banho-maria a 56 °C por 1 hora. Passada essa incubação, cada microtubo foi agitado em vórtex por 10 segundos e, em seguida, submetido à fervura (100 °C) por 10 minutos e novamente agitado em vórtex por mais 10 segundos. Imediatamente, os microtubos foram centrifugados a 9660 x g por 3 minutos; o sobrenadante obtido dessa centrifugação foi transferido para um novo microtubo estéril, enquanto o *pellet* foi descartado. O DNA obtido foi estocado a -20 °C, e sua concentração foi determinada no Nanodrop plus (Healthcare Bio-sciences, Suécia).



#### 4.4. Detecção dos genes *agrA*, *agrBD*, *agrC*, *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *srtA* e *tagO* em *S. pseudintermedius* e *agrB*, *tagO*, *srtA*, *ctaA* e *dltA* em *S. schleiferi*.

A detecção dos genes *agrA*, *agrBD*, *agrC*, *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *srtA* e *tagO* foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para cada um destes genes separadamente em amostras que ainda não tinham sido caracterizadas por Coimbra (2021), ou seja, 13 amostras de *S. pseudintermedius* e 30 amostras de *S. schleiferi*. Os oligonucleotídeos que foram utilizados neste estudo foram desenhados com o auxílio do site IDT DNA (<https://www.idtdna.com/>) utilizando o genoma da amostra de *S. pseudintermedius* ED99 como referência. Os oligonucleotídeos para os genes *agrA* e *agrBD* (Chitra, Jayanthi e Nagaraja, 2015), e *agrC* de *S. pseudintermedius* foram cedidos pelo professor Bruno Penna (Tabela 3). Para desenhar os oligonucleotídeos para *S. schleiferi* foi utilizada a amostra de referência *S. schleiferi* MGYG-HGUT-01437 (Tabela 4). Cada reação de 50 µL foi composta por: 1 µL do DNA genômico a 100 µg/µL (obtido de acordo com o item 4.4), 1 µL de cada oligonucleotídeo a 50 pmol, 1 µL de 20 Class Five Taq DNA polimerase (Ampliqon, Dinamarca) a 5 U/µL, 1,25 µL de Neotaq dNTP Mix (Intron, Brasil) a 10 mM e 5 µL de 10x Class Five Buffer (Intron, Brasil). A reação ocorreu em um termociclador (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e o ciclo se iniciou com uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos. Em seguida, foram realizados 30 ciclos que compreenderam a uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, uma etapa para o anelamento dos oligonucleotídeos em temperatura adequada para cada par de *primers* por 30 segundos e uma etapa de extensão para atividade da enzima a 72 °C por 30 segundos. Por fim, um ciclo de extensão final foi realizado a 72 °C por 5 minutos. A análise dos produtos da reação de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1 % (p/v) em solução tampão TBE 0,5 X a 100 V por 60 minutos, utilizando 100 bp DNA Ladder RTU (Kasvi, Itália) como padrão de massa molecular. O gel foi visualizado através de transiluminador (Bio-Imaging Systems). Como controle positivo das reações de PCR, foram utilizadas as amostras *S. pseudintermedius* ED99 e *S. schleiferi* SD24.

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons gerados na PCR para detecção dos genes *agrA*, *agrBD*, *agrC*, *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *srtA* e *tagO* em *S. pseudintermedius*.

LCGP, UFF: Laboratório de Cocos Gram Positivos, Universidade Federal Fluminense.

Gene alvo	Produto da expressão	Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento	Referências
<i>agrA</i>	AgrA	<i>agr-AF</i> <i>agr-AR</i>	CCTATCCGGGAAATTGGCTTT CGGACAATGTATTCCCTTGATACGA	850	60 °C	Chitra, Jayanthi e Nagaraja, 2015
<i>agrBD</i>	AgrBD	<i>agr-BDF</i> <i>agr-BDR</i>	GGATGAGAATAATGTAATCCC TTTGAC AACAAACCAATCACAAACAGTTAGG	946	60 °C	Chitra, Jayanthi e Nagaraja, 2015
<i>agrC</i>	AgrC	<i>agr-CF</i> <i>agr-CR</i>	TTTGCGTGATTTTCATCCGCC TGGTCTTTGCGCTAGGTTGT	609	60 °C	LCGP, UFF
<i>ctaA</i>	Heme A sintase	<i>ctaAF</i> <i>ctaAR</i>	GCGAAACCTAAAGTGGCTTG GTAGGTTTTGTGGTAATAATGCGC	149	52 °C	Coimbra, 2021
<i>dltA</i>	DltA	<i>dltAF</i> <i>dltAR</i>	CACGACAGATACACCGCTTAAT CCTGTTGAGCCCGATGTAAA	141	52 °C	Coimbra, 2021
<i>nuc2</i>	Nuc2	<i>nuc2F</i> <i>nuc2R</i>	GTCTTCAACGGATGTGAGAGG GGCGTATTCGGTTTAACTGTTTC	144	52 °C	Coimbra, 2021
<i>srtA</i>	Sortase A	<i>srtAF</i> <i>srtAR</i>	AGGATGAATCACTCAAAGACCAA ATATTTGCGCGTTTCTTTACCC	140	52 °C	Coimbra, 2021
<i>tagO</i>	TagO	<i>tagOF</i> <i>tagOR</i>	CGACACTGAACATAAACGCGATAG GCCGCGTTAAAAAAGGTCAAC	132	52 °C	Este estudo

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons gerados na PCR para detecção dos genes *agrB*, *ctaA*, *dltA*, *srtA* e *tagO* em *S. schleiferi*.

Gene alvo	Produto da expressão	Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Amplicon	Temperatura de anelamento	Referências
<i>agrB</i>	AgrB	<i>agr-BF</i> <i>agr-BR</i>	CGGTTAGGCATGCATATAGTGG GTGAACTTTCTGCATGTGCAC	139	55 °C	Este estudo
<i>ctaA</i>	Heme A sintase	<i>ctaAF</i> <i>ctaAR</i>	CATACGGTTCATGGCCTGTAC CGCATGAATGTAAGCGACAAG	128	54,5 °C	Este estudo
<i>dltA</i>	DltA	<i>dltAF</i> <i>dltAR</i>	GCAGCGCACCAGTTGTTGTATACG GAGAAATACGATTTGCAGGGATG	125	54 °C	Este estudo
<i>srtA</i>	Sortase A	<i>srtAF</i> <i>srtAR</i>	GCCGAAAATCGATGCCTATTTTAC GATGGAATTTCAAGAACGCCAAC	156	54,5 °C	Este estudo
<i>tagO</i>	TagO	<i>tagOF</i> <i>tagOR</i>	GGAGGATCGGCGATTTTACTC CACAACTGAACCTAGAAGTAACG	96	53°C	Este estudo

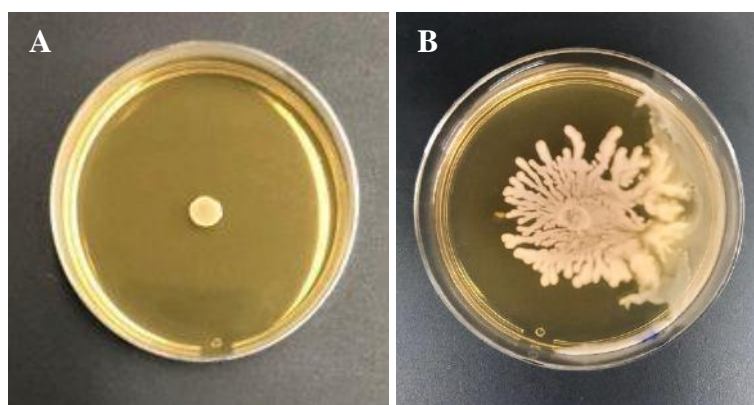
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da motilidade das amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*

Todas as amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* foram analisadas quanto à capacidade de realizar motilidade em meio de cultura semissólido. A avaliação dos resultados ocorreu de forma visual, mensurando o diâmetro da colônia, em comparação com o diâmetro exibido pela amostra de *S. aureus* MU50 utilizada como controle negativo para motilidade (Figura 1A), e pela amostra de *S. pseudintermedius* RF30 (Figura 1B) usado como controle positivo do estudo devido sua alta reprodutibilidade do fenótipo de motilidade ao longo dos experimentos.

Para a padronização da motilidade de cada amostra, foi proposta recentemente uma classificação de motilidade de acordo com o diâmetro de cada colônia nos experimentos de motilidade (Coimbra, 2021). De acordo com essa classificação, as amostras que exibiram diâmetros médios menor que 8 mm foram classificadas como imóveis; amostras com diâmetros médios até 14,9 mm foram classificadas como baixa motilidade; amostras com diâmetros médios entre 15 mm e 20 mm foram classificadas como motilidade média; e amostras com diâmetros médios a partir de 20 mm foram classificadas como alta motilidade.

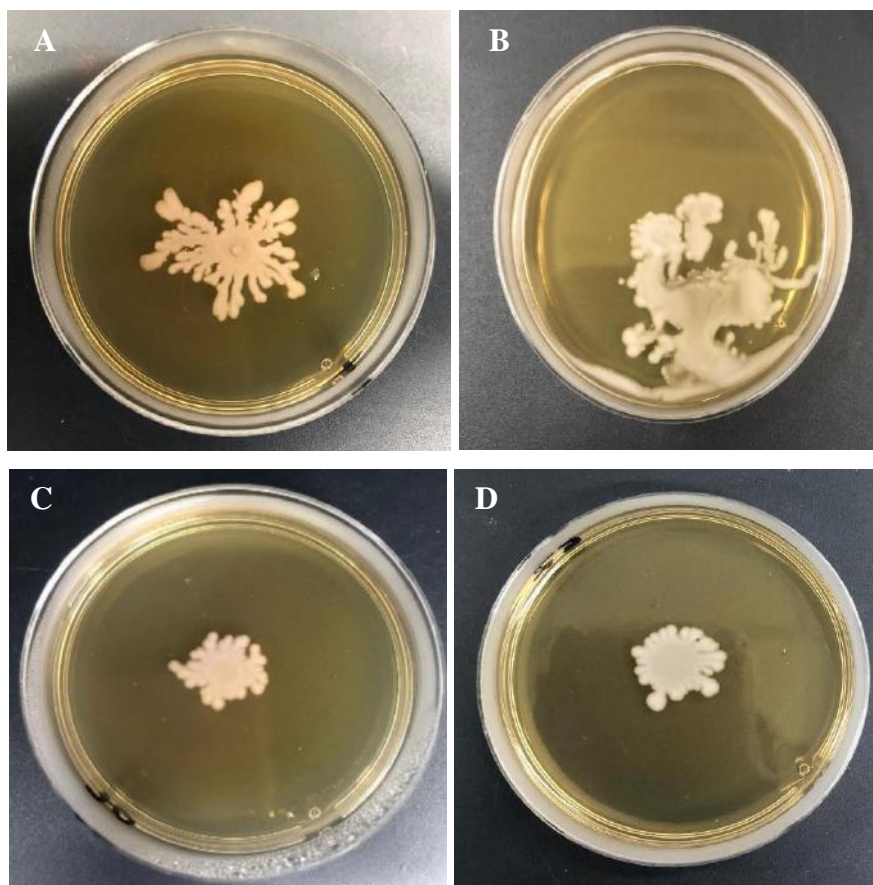
As médias do diâmetro das colônias observadas nestas amostras em meio semissólido e sua classificação de motilidade, obtidas após experimentos independentes, são apresentadas nas seções abaixo em tabelas referentes a cada uma das espécies.



**Figura 2:** Controles do ensaio de motilidade em TSB + 0,24% de ágar. A: amostra *S. aureus* MU50 (controle negativo); B: amostra *S. pseudintermedius* RF30 (controle positivo)

### 5.1.1. *S. pseudintermedius*

Todas as 49 amostras de *S. pseudintermedius* testadas apresentaram o fenótipo de motilidade exibindo colônias com morfologias variadas, como pode ser observado na Figura 3. De acordo com os critérios estabelecidos por Coimbra, 2021, 36,7% (18 amostras) das amostras foram classificadas como alta motilidade, 28,5% (14 amostras) como motilidade média e 34,6% (17 amostras) foram classificadas como baixa motilidade (Tabela 5).



**Figura 3:** Morfologia das colônias móveis de *S. pseudintermedius* em TSB + 0,24% de ágar. A: amostra RF30; B: amostra 1610; C: amostra 1729; D: amostra 1634.

**Tabela 5:** Motilidade das amostras de *S. pseudintermedius* em meio semissólido e controles (MU50 e RF30).

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Desvio padrão (mm)</b>	<b>Classificação de motilidade</b>
MU50 (CN)	6,6	± 1,4	Imóvel
RF30 (CP)	25,2	± 11,4	Alta
RF33	24	± 7,9	Alta
RF34	26	± 11,0	Alta
RF35	26	± 10,0	Alta
RF37	25,3	± 2,8	Alta
RF38	20	± 1,0	Alta
RF39	20,3	± 4,8	Alta
RF73	28,4	± 3,3	Alta
SD30	21,8	± 10,3	Alta
SD37	27,5	± 10,3	Alta
SD38	24,7	± 8,2	Alta
SD39	20,5	± 9,0	Alta
SD41	22,3	± 5,4	Alta
SD44	22,3	± 4,8	Alta
SD55	22,7	± 3,2	Alta
SD57	32,3	± 4,5	Alta
SD62	22,7	± 13,5	Alta
1610	23,7	± 11	Alta
8SD1	15,4	± 4,9	Média
13SD2	18,5	± 7,1	Média
16SD1	16,9	± 3,3	Média
RF28	18	± 7,5	Média
RF29	16,2	± 7,1	Média

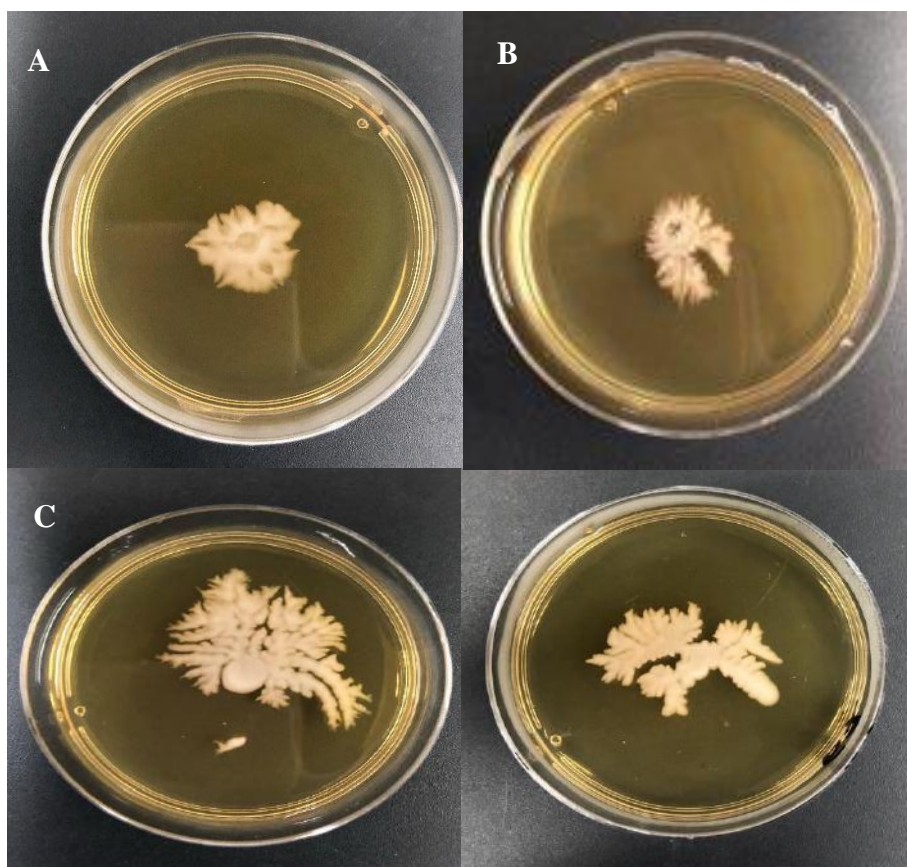
**Tabela 5:** continuação

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Desvio padrão (mm)</b>	<b>Classificação de motilidade</b>
SD12	16,6	± 1,8	Média
SD20	15,2	± 8,4	Média
SD31	19,9	± 7,2	Média
SD61	18,7	± 9,0	Média
SD77	17,2	± 8,9	Média
SD79	18	± 2,0	Média
1611	17,7	± 9,8	Média
16107	15	± 3,5	Média
1729	15	± 4,9	Média
ED99	14,5	± 1,8	Baixa
RF31	12,3	± 1,3	Baixa
RF32	12	± 1,6	Baixa
RF36	14,5	± 0,5	Baixa
SD19	11,5	± 0,5	Baixa
SD36	14,2	± 3,7	Baixa
SD46	12,7	± 2,9	Baixa
SD99	14,5	± 1,6	Baixa
1602	13,7	± 1,5	Baixa
1620	11,7	± 1,5	Baixa
1625	13,7	± 4,7	Baixa
1633	10,7	± 1,5	Baixa
1634	12	± 5	Baixa
1683	11,3	± 2,1	Baixa
16100	12,3	± 0,6	Baixa
16105	10,7	± 1,5	Baixa
1733	12,7	± 3,1	Baixa

CN: controle negativo; CP: controle positivo

### 5.1.2. *S. schleiferi*

Todas as 30 amostras de *S. schleiferi* testadas apresentaram o fenótipo de motilidade exibindo colônias com morfologias variadas, como pode ser observado na Figura 4. O total de 36,6% (11 amostras) das amostras foram classificadas como alta motilidade, 23,3% (7 amostras) como motilidade média e 40% (12 amostras) foram classificadas como baixa motilidade (Tabela 6).



**Figura 4:** Morfologia das colônias móveis de *S. schleiferi* em TSB + 0,24% de ágar. A: amostra 1664 B: amostra 1682; C: amostra 1715; D: amostra 1667.



**Tabela 6:** Motilidade das amostras de *S. schleiferi* em meio semissólido e controles (MU50 e RF30)

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Desvio padrão (mm)</b>	<b>Classificação de motilidade</b>
MU50 (CN)	6,6	± 1,4	Imóvel
RF30 (CP)	25,2	± 11,4	Alta
SD23	25,8	± 10,2	Alta
SD24	26,8	± 8,5	Alta
SD25	21	± 12,8	Alta
SD42	22,8	± 11,2	Alta
SD52	27,5	± 6,5	Alta
SD53	32	± 3,0	Alta
1667	23,3	± 13,3	Alta
1682	20,7	± 12,5	Alta
1715	26,7	± 6	Alta
SD15	15,1	± 2,5	Média
SD43	16	± 11,0	Média
SD47	18,5	± 7,5	Média
SD54	15	± 2,0	Média
1668	17,3	± 11,5	Média
1670	17,3	± 7	Média
SCH04	16,7	± 11,7	Média
RF46	9,3	± 2,1	Baixa
RF47	11,7	± 4,5	Baixa
1604	8,3	± 2,1	Baixa
1605	12,7	± 7,4	Baixa
1608	9	± 1,7	Baixa
1660	11,3	± 5	Baixa
1664	13	± 9,9	Baixa
1671	8,3	± 2,1	Baixa

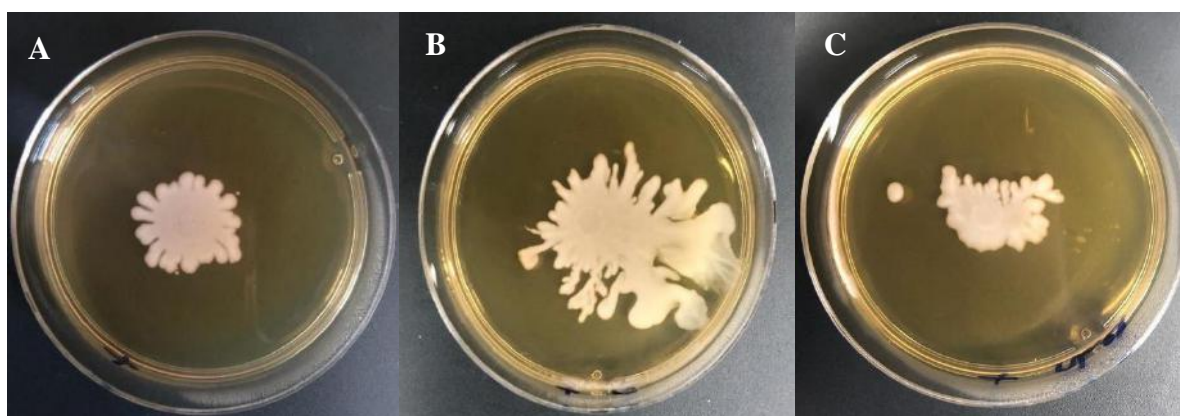
**Tabela 6:** continuação

Amostra	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)	Classificação de motilidade
1679	13,7	± 4	Baixa
1680	11,3	± 4,9	Baixa
16121	10,7	± 5,5	Baixa
SCH08	9	± 2,6	Baixa

CN: controle negativo; CP: controle positivo

5.1.3. Fenótipo de motilidade da amostra RF30 de *S. pseudintermedius* testada com a suplementação de 1% de glicose ou 1% de NaCl no meio semissólido.

O aumento no espalhamento da amostra RF30 de *S. pseudintermedius* (Figura 5A, Tabela 7) foi observado quando 1% de glicose foi adicionado ao meio semissólido (Figura 5B, Tabela 7). Já a adição de 1% de NaCl resultou em diminuição do diâmetro da amostra em meio semissólido (Figura 5C, Tabela 7).



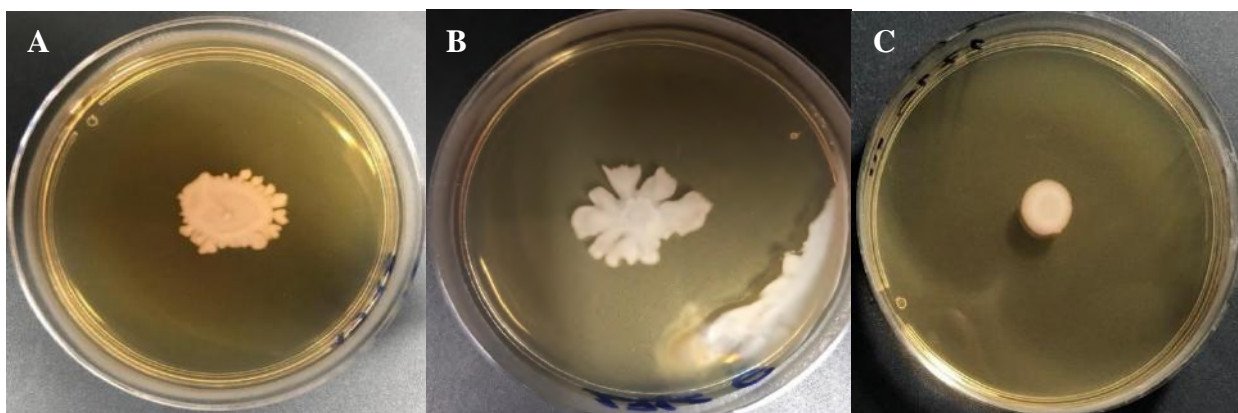
**Figura 5:** Morfologia das colônias móveis de *S. pseudintermedius* em TSB + 0,24% de ágar e suas respectivas suplementações. A: amostra RF30 em meio semissólido; B: amostra RF30 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose; C: amostra RF30 em meio semissólido suplementado com 1% de NaCl.

**Tabela 7:** Motilidade da amostra de *S. pseudintermedius* RF30 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose ou 1% NaCl 30

Amostras	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
RF30	24	± 1,7
RF30 1% glicose	30	± 8,7
RF30 1% NaCl	17,6	± 4,9

5.1.4. Fenótipo de motilidade da amostra 1715 de *S. schleiferi* testada com a suplementação de 1% de glicose ou 1% de NaCl no meio semissólido.

A adição de 1% de glicose no meio de cultura semissólido ocasionou um aumento no fenótipo de motilidade da amostra 1715 de *S. schleiferi* (Figura 6B, Tabela 8). No entanto, a adição de 1% de NaCl no meio resultou em uma diminuição significativa da motilidade dessa amostra (Figura 6C, Tabela 8), assemelhando-se com a amostra MU50 de *S. aureus* utilizada como controle negativo do estudo.



**Figura 6:** Morfologia das colônias móveis de *S. schleiferi* em TSB + 0,24% de ágar e suas respectivas suplementações. A: amostra 1715 em meio semissólido; B: amostra 1715 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose; C: amostra 1715 em meio semissólido suplementado com 1% de NaCl.

**Tabela 8:** Motilidade da amostra de *S. schleiferi* 1715 em meio semissólido suplementado com 1% de glicose ou 1% NaCl.

Amostras	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
1715	18,3	± 0,6
1715 + 1% de glicose	23	± 3,6
1715 + 1% NaCl	8,3	± 1,1

## 5.2. Detecção dos genes *agrA*, *agrBD* e *agrC* nas amostras de *S. pseudintermedius*

Das 49 amostras de *S. pseudintermedius* utilizadas neste estudo, 36 amostras foram selecionadas de forma aleatória para análise da presença dos genes *agrA*, *agrBD* e *agrC*. O gene *agrC* foi detectado em 63,9% (23 amostras) das amostras, enquanto os genes *agrA* e *agrBD* foram detectados em 64,4% (25 amostras) das amostras, mas não exatamente nas mesmas amostras. A presença dos genes *agrA*, *agrBD* e *agrC* foi detectada simultaneamente em 41,7% (15 amostras) das amostras, e aproximadamente 5,6% (2 amostras) não apresentaram nenhum dos três genes que compõem o operon *agr* (Tabela 9). Em relação à classificação da motilidade, observamos que das 17 amostras classificadas como motilidade alta, 7 (41,2%) apresentaram todos os genes do operon *agr*. Dentre as 18 amostras com motilidade média, 8 (44,4%) foram positivas para todos genes. Além disso, 2 amostras sem nenhum gene do operon detectado apresentaram motilidade alta e média nos ensaios. Tal análise sugere que a presença do operon *agr* não tem impacto no nível de motilidade em *S. pseudintermedius*.

**Tabela 9:** Detecção dos genes *agrA*, *agrBD* e *agrC* nas amostras de *S. pseudintermedius*

<b>Amostra</b>	<b><i>agrA</i></b>	<b><i>agrBD</i></b>	<b><i>agrC</i></b>	<b>Operon <i>agr</i> completo</b>	<b>Classificação de motilidade</b>
RF30	-	-	+	-	Alta
RF33	-	-	+	-	Alta
RF34	+	+	+	sim	Alta
RF35	+	+	+	sim	Alta
RF37	-	+	+	-	Alta
RF38	-	-	-	-	Alta
RF39	+	+	-	-	Alta
RF73	+	-	+	-	Alta
SD30	+	+	+	sim	Alta
SD37	+	+	+	sim	Alta
SD38	+	+	+	sim	Alta
SD39	+	+	-	-	Alta
SD41	+	+	-	-	Alta
SD44	+	+	+	sim	Alta
SD55	-	+	+	-	Alta
SD57	+	+	+	sim	Alta
SD62	-	-	+	-	Alta
8SD1	+	-	-	-	Média
13SD2	+	-	-	-	Média
16SD1	+	-	+	-	Média
ED99	+	+	+	sim	Média
RF28	+	+	+	sim	Média
RF29	+	+	-	-	Média
RF31	-	+	-	-	Média
RF32	+	+	+	sim	Média
RF36	-	+	-	-	Média
SD12	+	+	-	-	Média

**Tabela 9:** continuação

<b>Amostra</b>	<b><i>agrA</i></b>	<b><i>agrBD</i></b>	<b><i>agrC</i></b>	<b>Operon <i>agr</i> completo</b>	<b>Classificação de motilidade</b>
SD19	+	-	-	-	Média
SD20	+	+	+	sim	Média
SD31	+	+	-	-	Média
SD36	+	+	+	sim	Média
SD46	+	+	+	sim	Média
SD61	+	+	+	sim	Média
SD77	+	+	+	sim	Média
SD79	-	-	+	-	Média
SD99	-	-	-	-	Média

### 5.3. Detecção do gene *agrB* nas amostras de *S. schleiferi*

Das 30 amostras de *S. schleiferi* testadas, aproximadamente 46,6% (14 amostras) das amostras apresentaram o gene *agrB* (Tabela 10). Em relação à motilidade, observamos que das 11 amostras classificadas como motilidade alta, 3 (27,3%) apresentaram o gene *agrB*. Dentre as 7 amostras com motilidade média, 3 (42,9%) apresentava o gene, enquanto que das 12 amostras classificadas como motilidade baixa, 8 (66,7%) foram positivas para o gene *agrB*.

**Tabela 10:** Detecção de *agrB* nas amostras de *S. schleiferi*

<b>Amostra</b>	<b><i>agrB</i></b>	<b>Classificação de motilidade</b>
RF48	+	Alta
RF49	+	Alta
SD23	-	Alta
SD24	-	Alta
SD25	-	Alta
SD42	-	Alta
SD52	-	Alta
SD53	-	Alta
1667	-	Alta
1682	+	Alta
1715	-	Alta
SD15	-	Média
SD43	-	Média
SD47	-	Média
SD54	+	Média
1668	+	Média
1670	-	Média
SCH04	+	Média
RF46	+	Baixa
RF47	-	Baixa
1604	+	Baixa
1605	-	Baixa
1608	+	Baixa
1660	+	Baixa
1664	-	Baixa
1671	+	Baixa
1679	+	Baixa

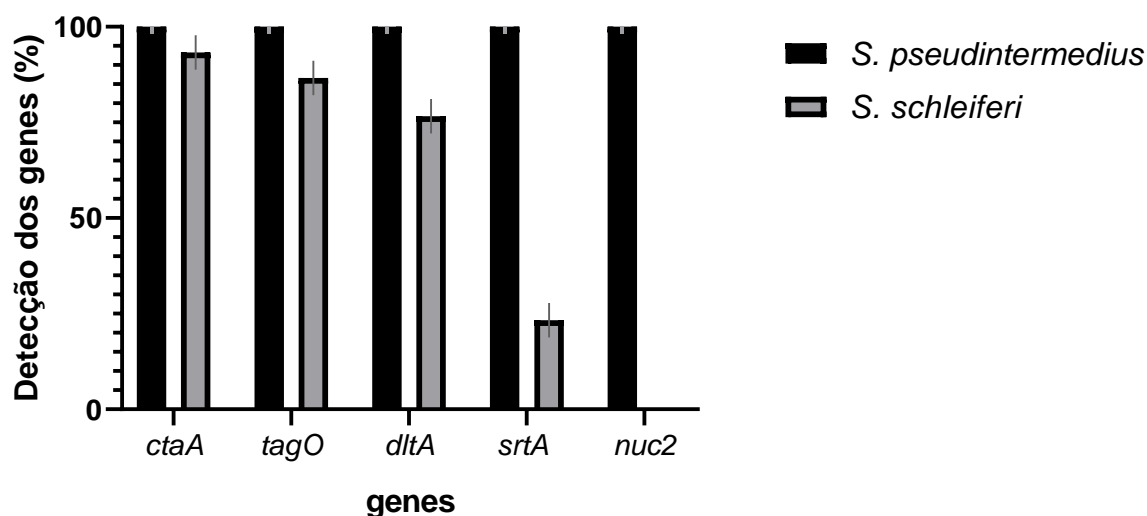
**Tabela 10:** continuação

Amostra	<i>agrB</i>	Classificação de motilidade
1680	+	Baixa
16121	-	Baixa
SCH08	+	Baixa

5.4. Detecção dos genes *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *tagO* e *srtA* em amostras de *S. pseudintermedius* e dos genes *ctaA*, *dltA*, *srtA* e *tagO* em *S. schleiferi*.

Das 49 amostras de *S. pseudintermedius* utilizadas neste estudo, 36 amostras foram selecionadas aleatoriamente para análise da presença dos genes *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *tagO* e *srtA*. Todas as amostras de *S. pseudintermedius* testadas apresentaram os genes citados.

Das 30 amostras de *S. schleiferi* avaliadas, 93,3% (28 amostras) apresentaram o gene *ctaA*, 86,6% (26 amostras) apresentaram o gene *tagO*, 76,6% (23 amostras) apresentaram o gene *dltA* e apenas 23,3% (7 amostras) foram positivas para o gene *srtA* (Figura 7).



**Figura 7:** Detecção dos genes *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *tagO* e *srtA* em *S. pseudintermedius* e dos genes *ctaA*, *dltA*, *srtA* e *tagO* em *S. schleiferi*.



A presença dos genes foi também avaliada de acordo com a classificação de motilidade de cada amostra (Tabela 11). Dentre as 11 amostras classificadas como motilidade alta, somente 1 (9,1%) amostra foi positiva para todos os genes avaliados. O mesmo ocorreu para as 7 amostras com motilidade média (14,3%), enquanto que entre as 12 amostras que apresentaram motilidade baixa, 4 (33,3%) foram positivas para todos os genes. Ao analisarmos a correlação entre a presença de cada gene e o nível de motilidade, não foi possível observar uma correlação clara entre em relação aos genes *ctaA*, *dltA* e *tagO*, pois eles foram detectados em proporções semelhantes nas diferentes classificações de motilidade. O gene *ctaA* foi detectado em 90,9% das amostras com alta motilidade, 100% na média e 91,7% na baixa. Já o gene *dltA* estava presente em 72,7% com alta motilidade, 85,7% com média e 83,3% com baixa motilidade. O gene *tagO* foi detectado em 81,8% das amostras com alta motilidade, 100% na média e 83,3% na baixa. O gene *srtA* foi o menos frequentemente detectado entre as amostras de *S. schleiferi* e apresentou maior presença entre as amostras com baixa motilidade (33,3%) do que entre as amostras com alta (18,2%) e média (14,3%) motilidade, o que pode indicar um papel negativo na motilidade desta espécie.

**Tabela 11:** Detecção dos genes *ctaA*, *dltA*, *srtA* e *tagO* em *S. schleiferi*.

Amostra	<i>ctaA</i>	<i>dltA</i>	<i>srtA</i>	<i>tagO</i>	Classificação de motilidade
RF48	+	+	-	-	Alta
RF49	-	+	-	+	Alta
SD23	+	+	-	+	Alta
SD24	+	+	+	+	Alta
SD25	+	+	-	+	Alta
SD42	+	+	-	+	Alta
SD52	+	+	-	+	Alta
SD53	+	-	-	+	Alta
1667	+	-	-	+	Alta
1682	+	-	+	+	Alta
1715	+	+	-	-	Alta
SD15	+	-	-	+	Média
SD43	+	+	-	+	Média
SD47	+	+	+	+	Média
SD54	+	+	-	+	Média
1668	+	+	-	+	Média
1670	+	+	-	+	Média
SCH04	+	+	-	+	Média
RF46	+	+	-	+	Baixa
RF47	+	+	+	+	Baixa
1604	+	-	-	+	Baixa
1605	-	-	-	+	Baixa
1608	+	+	+	+	Baixa
1660	+	+	-	+	Baixa
1664	+	+	-	+	Baixa
1671	+	+	+	+	Baixa
1679	+	+	-	-	Baixa
1680	+	+	+	+	Baixa
16121	+	+	-	+	Baixa
SCH08	+	+	-	-	Baixa

## 6. DISCUSSÃO

Apesar de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* serem encontrados na microbiota de animais saudáveis, essas espécies são consideradas importantes patógenos para medicina veterinária. Essas bactérias podem causar infecções de pele, como piodermite e são consideradas as principais espécies responsáveis pela ocorrência de otite externa em cães (Devriese *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2019). Apesar de serem frequentemente associadas a infecções caninas, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* já foram descritos em casos esporádicos como patógeno humano, principalmente quando há contato direto entre humanos e cães (Robb *et al.*, 2017). Entender seus mecanismos de colonização, patogênese e transmissão são fatores importantes para o combate das infecções por estes patógenos, visto que, são considerados um problema emergente na clínica veterinária, tanto do ponto de vista da saúde animal, como também de saúde pública.

A motilidade bacteriana é vantajosa para diversas espécies. Apesar das espécies do gênero *Staphylococcus* serem classicamente consideradas imóveis, a motilidade já foi descrita na literatura em cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* (Henrichsen, 1972; Kaito e Sekimizu, 2007; Dordet-Frisoni *et al.*, 2008). As espécies *S. aureus* e *S. xylosus* apresentam um fenótipo de motilidade passiva em meio semissólido, sendo capazes de formar colônias gigantes. Enquanto a motilidade realizada por *S. aureus* é denominada *spreading*, a motilidade *S. xylosus* é chamada de *sliding*. Já a motilidade realizada por *S. epidermidis* é definida como *darting*, um processo pelo qual células bacterianas são ejetadas do crescimento inicial dando origem a novas colônias (Kaito e Sekimizu, 2007; Dordet-Frisoni *et al.*, 2008; Pollitt e Diggle, 2017).

Estudos realizados por nosso grupo têm analisado a presença do fenótipo de motilidade em espécies do gênero *Staphylococcus* (Coimbra, 2018). Os resultados mostraram que, além das espécies já relatadas na literatura, cepas de *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. coagulans* apresentaram capacidade de se locomover em meio semissólido semelhante ao deslocamento relatado em *S. aureus* (Coimbra, 2018). Em alguns experimentos, foi observado também, a formação de colônias além da colônia principal do inóculo, que em algumas vezes também exibiram o fenótipo de motilidade. Este fenômeno se assemelha à motilidade *darting*, descrita em *S. epidermidis*, em que as bactérias são ejetadas para fora da colônia principal, formando novas colônias bacterianas (Henrichsen, 1972, Coimbra, 2018). No entanto, mais estudos são necessários

para afirmar se este fenômeno se trata da motilidade *darting*, visto que a formação de novas colônias pode estar associada a outros fatores, como por exemplo, respingos no meio de cultura ao inocular a amostra no centro da placa. Além disso, algumas amostras exibiram rastros físicos no ágar, assemelhando-se com *comets* observados na motilidade *sliding*.

Neste estudo, ampliamos o número de amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* avaliadas com a finalidade de entendermos se o fenômeno previamente descrito seria frequente entre cepas das espécies. Além disso, a detecção de cepas imóveis poderia apontar para possíveis mecanismos envolvidos no fenótipo de motilidade em superfícies destas espécies. Nós pudemos observar que todas as amostras apresentaram motilidade em meio semissólido nas condições originais, o que confirmou os resultados anteriores visto em estudos do nosso grupo (Coimbra, 2018; Coimbra, 2021).

A capacidade de locomoção em meio semissólido de cada amostra de *Staphylococcus* foi classificada utilizando os critérios estabelecidos anteriormente pelo nosso grupo, o qual define as amostras como imóveis, motilidade baixa, média ou alta (Coimbra, 2021). É importante mencionar que, como no estudo anterior, os ensaios de motilidade apresentaram grande variabilidade entre as réplicas. Tal fato pode ser observado pelo desvio padrão obtido na análise das réplicas. A motilidade em meio semissólido das amostras testadas foi dependente de diversos fatores como temperatura, umidade, tempo de incubação, e também, do fabricante específico do ágar utilizado na preparação do meio de cultura, uma vez que, foi observado a não reprodução do fenótipo de motilidade quando utilizamos ágar de diferentes fabricantes na mesma concentração de 0,24%. Este fato ressalta a influência da composição do meio de cultura e nas condições experimentais na motilidade bacteriana.

Para verificar a influência de diferentes condições no fenótipo de motilidade em superfícies, avaliamos a possível influência da adição de glicose e cloreto de sódio na motilidade das amostras selecionadas de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*. A glicose e o cloreto de sódio foram escolhidos por terem sido relatados anteriormente como fatores que podem impactar na formação de biofilmes de *S. aureus*. Um estudo mostrou que a suplementação de glicose ao meio de cultura foi capaz de promover a formação e estabilização do biofilme, já a adição de NaCl causou variações na quantificação desses biofilmes (Lade *et al.*, 2019). Nossos resultados mostraram que, a adição de 1% de glicose ao meio semissólido, aumentou a capacidade de locomoção pelo ágar das amostras

de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*. Este resultado condiz com o que já foi descrito na literatura, em que a adição de glicose e outros açúcares eram capazes de estimular o *spreading* em *S. aureus* (Ueda *et al.*, 2011). No entanto, a adição NaCl resultou na diminuição da motilidade destas amostras, com destaque para a amostra selecionada de *S. schleiferi*, que nos experimentos com a suplementação de 1% de NaCl, apresentou um fenótipo de motilidade semelhante ao observado na amostra MU50 de *S. aureus*, usada como controle negativo do estudo. Este é o primeiro estudo que avalia a adição de NaCl na motilidade de *Staphylococcus* spp.

Em *S. aureus*, já foi descrito que a regulação do *spreading* está associada à secreção de PSMs mediada pelo operon *agr* que é um sistema de *quorum sensing* (Ueda *et al.*, 2011; Tsompanidou *et al.*, 2013). No entanto, nossos resultados através de análises de PCR, mostraram que apenas 41,7% das amostras de *S. pseudintermedius* apresentaram todos os genes do operon *agr* (*agrA*, *agrBD* e *agrC*), e 46,6% das amostras de *S. schleiferi* apresentaram o gene *agrB*, sendo todas as amostras móveis. Duas amostras de *S. pseudintermedius* e 16 amostras de *S. schleiferi* que não apresentaram a presença de nenhum dos genes do operon *agr*, também foram capazes de realizar motilidade em meio semissólido. Além disso, nenhuma correlação entre o nível de motilidade de cada amostra (alta, média ou baixa) pode ser observada entre a presença do operon *agr* completo em *S. pseudintermedius* ou do gene *agrB* em *S. schleiferi*. Assim, nossos resultados indicam que o operon *agr* não é essencial para o fenótipo de motilidade destas duas espécies. Apesar disso, mais estudos são necessários para esclarecer a importância do operon *agr* na motilidade de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*.

Um estudo relatou que a presença do gene *ctaA*, envolvido na biossíntese do Heme, possui influência expressiva no aumento do *spreading* de *S. aureus* (Choby e Skaar, 2016). Além disso, em outro trabalho foi descrito que a deleção dos genes *dltA* e *tagO*, envolvidos na síntese dos ácidos teicóicos da parede celular de bactérias gram-positivas, resultou em uma diminuição dos *spreading*, sugerindo que a presença dos mesmos é importante para a motilidade de *S. aureus* (Kaito e Sekimizu, 2007). Todas as 36 amostras de *S. pseudintermedius* utilizadas para detecção dos genes via PCR apresentaram a presença dos genes *ctaA*, *nuc2*, *dltA* e *tagO*, independentemente do nível de motilidade (média ou alta). Em *S. schleiferi*, 93,3% das amostras apresentaram a presença do gene *ctaA*, 86,6% apresentaram o gene *tagO*, 76,6% apresentaram a presença de *dltA* e apenas 23,3% das amostras apresentaram a presença de *srtA*. A proporção de amostras positivas para os

genes *ctaA*, *dltA* e *tagO* foi semelhante entre perfis distintos de motilidade (alta, média e baixa). Além disso, amostras negativas para a presença do gene apresentaram motilidade, indicando que a presença destes genes não é essencial para o fenótipo em *S. schleiferi*.

Ao contrário dos outros genes estudados, a deleção do gene que codifica a sortase A (*srtA*), uma proteína de exportação de superfície celular, apresentou uma maior propagação do *spreading*, sendo relatada como antagonista do *spreading* de *S. aureus* (Tsompanidou *et al.*, 2012). Nossos estudos revelaram que todas as amostras de *S. pseudintermedius* apresentaram o gene *srtA*, sendo todas classificadas como de alta e média motilidade. Por não termos detectados amostras sem o gene *srtA* em *S. pseudintermedius*, não é possível determinar seu antagonismo da motilidade da espécie, porém por serem todas amostras móveis sugere-se que a presença do gene não é um fator limitante na motilidade da espécie. Entretanto, das 30 amostras de *S. schleiferi*, apenas 7 apresentaram o gene *srtA*, sendo 4 amostras classificadas como motilidade baixa, 1 amostra com motilidade média e 2 amostras com motilidade alta. Assim como em *S. aureus*, *srtA* pode ser um antagonista da motilidade em *S. schleiferi*, visto que poucas amostras apresentam este gene. Além disso, a proporção de amostras positivas para o gene *srtA* foi maior em amostras com motilidade baixa do que entre amostras com motilidade média e alta. Mais estudos são necessários para o esclarecimento do papel da SrtA na motilidade de *S. schleiferi*. Futuramente, pretendemos investigar a expressão dos genes aqui testados durante a motilidade e superfície a fim de entender os mecanismos envolvidos no fenótipo.

Em estudo anterior do nosso grupo, mostramos por qPCR, que a expressão de *tagO* em *S. pseudintermedius* não é significativamente diferente entre amostras em meio semissólido (móveis) e em meio sólido (não móveis). No entanto, a expressão dos genes *dltA* e *ctaA* foi menor em amostras em meio semissólido, quando comparadas em meio sólido (Coimbra, 2021). Devido a contratempos para realização dos experimentos, não foi possível analisar a expressão dos genes selecionados neste estudo em *S. schleiferi*. No entanto, pretendemos ampliar os estudos que desvendem os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na motilidade destas duas espécies tão importantes para clínica veterinária.

Tendo em mente o conceito *One Health* (Mackensie e Jeggo, 2019), que defende que a saúde de animais, meio ambiente e seres humanos está interligada, entender a biologia e comportamento de patógenos de origem animal, como no nosso trabalho, é de suma importância

para a saúde humana e ambiental. A maioria das novas doenças infecciosas emergentes se originam de animais, e isso acontece principalmente, em consequência das atividades humanas. Um fator de grande preocupação, é o exagerado uso de antimicrobianos nos setores humano, animal e ambiental e a disseminação de bactérias resistentes dentro e entre esses setores e em todo o mundo (McEwen e Collignon, 2018). Por isto, é imprescindível ações que incluam melhorias na regulação do uso antimicrobiano, vigilância, administração, controle de infecções, e também, do saneamento. *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* causam infecções oportunistas em seus hospedeiros e são associados a quadros patológicos veterinários como piodermite e otite externa em cães (Frank *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2019) Entretanto, já foram isolados de infecções em humanos, principalmente, em casos de contato direto entre o animal e ser humano. Essas duas espécies podem apresentar resistência a antimicrobianos, aumentando a preocupação de saúde pública. Entender seus mecanismos de virulência pode levar à descoberta de novas estratégias no tratamento e prevenção de infecções.

Apesar da motilidade ter sido recentemente relatada em *Staphylococcus* spp., este fenótipo neste gênero ainda é pouco estudado, e não relatado na literatura em *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*. Dessa forma, mais estudos são importantes para investigar os mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo de motilidade destas espécies que possuem grande importância na clínica veterinária.

## 7. CONCLUSÃO

- Todas as amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* apresentaram motilidade em ágar semissólido.
- As amostras testadas apresentaram colônias que se espalhavam pela superfície do ágar, características de motilidade do tipo *sliding/spreading*.
- De acordo com a classificação de motilidade, 44% das amostras de *S. pseudintermedius* foram classificadas com alta motilidade, 28% foram classificadas com média motilidade, e 38% foram classificadas com baixa motilidade.
- Entre as amostras de *S. schleiferi*, 47,7% foram classificadas com alta motilidade, 23,3% foram classificadas com média motilidade, e 40% foram classificadas com baixa motilidade.
- A adição de 1% de glicose aumentou o espalhamento das amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*
- A adição de 1% de cloreto de sódio diminuiu o espalhamento das amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*
- Os três genes do operon *agr* estavam presentes simultaneamente em 15 amostras de *S. pseudintermedius*, o que representa cerca de 41,7 % das cepas testadas.
- Somente 46,6% das amostras de *S. schleiferi* apresentaram o gene *agrB*.
- Todas as amostras de *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* testadas foram capazes de realizar motilidade mesmo na ausência de um dos genes do operon *agr*.
- Todas as amostras de *S. pseudintermedius* testadas apresentaram os genes *ctaA*, *dltA*, *nuc2*, *srtA* e *tagO*.
- Em *S. schleiferi*, 93,3% das amostras apresentaram o gene *ctaA*, 86,6% apresentaram o gene *tagO*, 76,6% apresentaram o gene *dltA* e apenas 23,3% das amostras apresentaram o gene *srtA*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A, Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*. 9(3):e02331-17.
- Assumpção, Y. M., Teixeira, I. M., Paletta, A., Ferreira, E. O., Pinto, T., & Penna, B. A. (2020). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for accurate discrimination of *Staphylococcus schleiferi* subspecies. *Veterinary microbiology*, 240, 108472.
- Balachandran, M., Bemis, D.A. e Kania, S.A. (2018). Expression and function of protein A in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Virulence* 9 (1), 390-401.
- Balbutskaya, A. A., Dmitrenko, O. A., Skvortsov, V. N. (2017). The modern characteristics of species identification of coagulase-positive bacteria of *Staphylococcus* genus. *Klin Lab Diagn*. 62(8), 497-502.
- Bannoehr, J, Ben Zakour, N.L., Reglinski, M., Inglis, N.F., Prabhakaran, S., Fossum, E., Smith, D.G., Wilson, G.J., Cartwright, R.A., Haas, J., Hook, M., van den Broek, A.H., Thoday, K.L. e Fitzgerald, J.R (2011). Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. *Infect Immun*. 79 (8), 3074-3086.
- Bannoehr, J., Ben Zakour, N. L., Waller, A. S., Guardabassi, L., Thoday, K. L., van den Broek, A., & Fitzgerald, J. R. (2008). Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into *agr* Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3791.
- Bannoehr, J., Brown, J. K., Shaw, D. J., Fitzgerald, R. J., van den Broek A. H., Thoday KL. (2012) *Staphylococcus pseudintermedius* surface proteins SpsD and SpsO mediate adherence to ex vivo canine corneocytes. *Vet Dermatol*. 2, 119-24, e26.
- Becker, K., Heilmann, C. e Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870–926.
- Bhooshan, S., Negi, V., Khatri, P.K. (2020) *Staphylococcus pseudintermedius*: An undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS Hyg. Infect. Control*. 15:32
- Bryan, J., Frank, L. A., Rohrbach, B. W., Burgette, L. J., Cain, C. L., Bemis, D. A. (2012). Treatment outcome of dogs with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. *Vet Dermatol*. 4, 361-8, e65.
- Burchard, R.P. (1981). Gliding motility of prokaryotes: ultrastructure, physiology, and genetics. *Annu. Rev. Microbiol*. 35, 497–529
- Cain, C.L., Morris, D.O. e Rankin, S.C. (2011). Clinical characterization of *Staphylococcus schleiferi* infections and identification of risk factors for acquisition of oxacillin-resistant strains in dogs: 225 cases (2003–2009). *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 239, 1566–1573.
- Canovas, J., Baldry, M., Bojer, M. S., Andersen, P. S., Grzeskowiak, P. K., Stegger, M., Damborg, P., Olsen, C. A., Ingmer, H. (2016). Cross-Talk between *Staphylococcus aureus* and Other Staphylococcal Species via the *agr* Quorum Sensing System. *Front Microbiol*. 7:1733.
- Cheng, A.G., DeDent, A.C., Schneewind, O. e Missiakas, D. (2011). A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol*. 19, 225–232.
- Chitra, M.A., Jayanthi, C. e Nagarajan, B. (2015). Detection and sequence analysis of accessory gene regulator genes of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates. *Vet. World* 8, 902-907.
- Choby, J.E. e Skaar, E.P. (2016). Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens. *J Mol Biol*. 428 (17), 3408-3428.

- Christensen, G.J. e Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef. Microbes* 5, 201-215.
- Clemmer, K.M., Bonomo, R.A. e Rather, P.N. (2011). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 157, 2534–2544.
- Coimbra, T.F.S. (2018). Avaliação da motilidade de amostras de *Staphylococcus* spp. em meio semissólido. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 71f.
- Coimbra, T.F.S. (2021). Análise da motilidade em meio semissólido de cepas de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus coagulans* e *Staphylococcus schleiferi* isoladas de fontes veterinárias, detecção e expressão de genes relacionados à motilidade estafilocócica em *S. pseudintermedius*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 66f.
- Cox, H. U., Newman, S. S., Roy A. F., Hoskins J. D. (1984). Species of staphylococcus isolated from animal infections. *Cornell Vet.* 74 (2), 124-35.
- Dailey, H.A., Dailey, T.A., Gerdes, S., Jahn, D., Jahn, M., O'Brian, M.R. e Warren, M.J. (2017). Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product. *Microbiol Mol Biol Rev.* 81 (1), e00048-16.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. e Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov. a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1569–1573.
- Dongari-Bagtzoglou, A. (2008) Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6 (2), 201-8.
- Dordet-Frisoni, E., Gaillard-Martinie, B., Talon, R. e Leroy, S. (2008). Surface migration of *Staphylococcus xylosum* on low-agar media. *Res. Microbiol.* 159, 263–269.
- Dotto, C., Serrat, A. L., Ledesma, M., Vay, C., Ehling-Schulz, M., Sordelli, D. O., Grunert, T., Buzzola, F. (2021). Salicylic acid stabilizes *staphylococcus aureus* biofilm by impairing the *agr* quorum-sensing system. *Sci. R.* 11, 2953.
- Frank, L. A., Loeffler, A. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet Dermatol.* 4, 283-91, e56.
- Gillaspy, A. F., Hickmon, S. G., Skinner, R. A., Thomas, J. R., Nelson, C. L., Smeltzer, M. S. (1995). Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect. Immun.* 63, 3373-3380
- Hederstedt, L. (2012). Heme A biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1817 (6), 920-927.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36, 478–503.
- Herzog, B., Wirth, R. (2012). Swimming behavior of selected species of *Archaea*. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1670-4.
- Huebner, J., Goldmann, D.A. (1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50, 223-236.
- Igimi, S., Takahashi, E., Mitsuoka, T. (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolado do meatus auditivo externo de cães com otite auditiva externa. *Int J Syst Bacteriol.* 40(4), 409-11.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 13, 271–279.

- Jarrell, K.F. e McBride, M.J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 466–476.
- Ji, G., Beavis, R. C. e Novick, R. P. (1995). Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 12055–12059.
- Josenhans, C. e Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291(8), 605-14.
- Kadlec K., Schwarz S. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Dermatol.* 23, 276-82, e55
- Kaito, C. e Sekimizu, K. (2007). Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 2553–2557.
- Kaito, C., Omae, Y., Matsumoto, Y., Nagata, M., Yamaguchi, H., Aoto, T., Ito, T., Hiramatsu, K. e Sekimizu, K. (2008). A novel gene, *fudoh*, in the SCCmec region suppresses the colony spreading ability and virulence of *Staphylococcus aureus*. *PloS One* 3, 3921.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. e Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225–1240.
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2019). Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1853.
- Le, K.Y. e Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci — an overview. *Front. Microbiol.* 6, 1174.
- Lee, G. Y., Lee, H. H., Hwang, S. Y., Hong, J., Lyoo, K. S., & Yang, S. J. (2019). Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. *Journal of veterinary science*, 20(2), e6.
- Little, S.V., Bryan, L.K., Hillhouse, A.E., Cohen, N.D. e Lawhon, S.D. (2019). Characterization of agr groups of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs in Texas. *mSphere* 4: e00033-19
- LPSN, List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*, 2022. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>; acesso em: 09/08/2022.
- Lynch, S. A., & Helbig, K. J. (2021). The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next?. *Veterinary sciences*, 8(1), 11
- Maali, Y., Badiou, C., Martins-Simões, P., Hodille, E., Bes, M., Vandenesch, F., Lina, G., Diot, A., Laurent, F. e Trouillet-Assant, S. (2018). Understanding the virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: a major role of pore-forming toxins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 221.
- Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2019). The One Health Approach-Why Is It So Important?. *Tropical medicine and infectious disease*, 4(2), 88.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, B.H. e Stahl, D.A. (2016). *Microbiologia de Brock*. 14 ed. (Porto Alegre: Artmed)
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

- Morris, D. O., Rook, K. A., Shofer, F.S., Rankin, S. C. (2006) Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Vet Dermatol.* 5, 332-7.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2017). *Microbiologia Médica*. 8 ed. (Rio de Janeiro: Elsevier).
- Mussi, M.A., Gaddy, J.A., Cabruja, M., Arivett, B.A., Viale, A.M., Rasia, R. e Actis, L.A. (2010). The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol.* 192 (24), 6336-6345.
- Nakamura, Y., Takahashi, H., Takaya, A., Inoue, Y., Katayama, Y., Kusuya, Y., Shoji, T., Takada, S., Nakagawa, S., Oguma, R., Saito, N., Ozawa, N., Nakano, T., Yamaide, F., Dissanayake, E., Suzuki, S., Villaruz, A., Varadarajan, S., Matsumoto, M., Kobayashi, T., Kono, M., Sato, Y., Akiyama, M., Otto, M., Matsue, H., Nuñez, G., Shimojo, N. (2020). *Staphylococcus agr* virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Sci Transl Med.* 12(551), eaay4068.
- Pinto, T.C., Souza, A.R., de Pina, S.E., Costa, N.S., Neto, A. A. B, Neves, F.P., Merquior, V.L., Dias, C.A., Peralta, J.M. e Teixeira, L.M. (2013). Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the ATPC gene. *J Clin Microbiol.* 51 (10), 3242-3249.
- Pitchenin, L.C., Brandão, L.N.S., Rosa, J.M.A., Kagueyama, F.C., Alves, A.D.S., Rocha, Í.S.M., Nakazato, L. e Dutra, V. (2018). Occurrence of toxin genes in *Staphylococcus pseudintermedius* from diseased dogs and other domestic and wild species. *J Infect Dev Ctries.* 11 (12), 957–961
- Pollitt, E.J.G. e Diggle, S.P. (2017). Defining motility in Staphylococci. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2943-2958.
- Pollitt, E.J.G., Crusz, S.A. e Diggle, S.P. (2015). *Staphylococcus aureus* forms spreading dendrites that have characteristics of active motility. *Sci. Rep.* 5, 17698
- Prevost G, Bouakham T, Piemont Y, Monteil H. (1995). Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* 76(3), 135-40.
- Robb, A.R., Wright, E.D., Foster, A.M.E., Walker, R. e Malone, C. (2017). Skin infection caused by a novel
- Sewid, A. H., Hassan, M. N., Ammar, A. M., Bemis, D. A. e Kania, S. A. (2018). Identification, cloning, and characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* coagulase. *Infect Immun.* 86 (8), e00027-18.
- Somayaji, R., Priyantha, M.A., Rubin, J.E. e Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85, 471–476.  
strain of *Staphylococcus pseudintermedius* in a Siberian husky dog owner. *JMM Case Rep.* 4, 1–4.
- Sun, E., Liu, S. e Hancock, R.E.W. (2018). Surfing motility: a conserved yet diverse adaptation among motile bacteria. *J Bacteriol.* 200 (23), e00394-18.
- Terry J, Neethirajan S. (2014) A novel microfluidic wound model for testing antimicrobial agents against *Staphylococcus pseudintermedius* biofilms. *J Nanobiotechnology.* 12:1.
- Thornton, D. J., Carlstedt, I., Howard, M., Devine, P. L., Price, M. R., Sheehan, J. K. (1996) Respiratory mucins: identification of core proteins and glycoforms. *Biochem J.* 316, 967-75.
- Tsompanidou, E., Denham, E.L., Becher, B., de Jong, A., Buist, G., van Oosten, M., Manson, W.L., Back, J.W., van Dijk, J.M. e Dreisbach, A. (2013). Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 886-895.

Tsompanidou, E., Denham, E.L., Sibbald, M.J.J.B., Yang, X., Seinen, J., Friedrich, A.W., Buist, G. e van Dijl, J.M. (2012). The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 7, e44646.

Tsompanidou, E., Sibbald, M.J.J.B., Chlebowicz, M.A., Dreisbach, A., Back, J.W., van Dijl, J.M., Buist, G. e Denham, E.L. (2011). Requirement of the *agr* locus for colony spreading of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 193, 1267–1272.

Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K. e De Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. J Clin Microbiol. 44 (12), 4609-4612.

Vorkapic, D., Pressler, K., Schild, S. (2016). Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. Curr Genet. 62(1), 71-9.

Weese J.S. e van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol 2010; 140: 418–29.